

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Identificação de flavonoides e taninos em extrato antiviral
de folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora*) por
espectrometria de massas de altíssima resolução (FT-ICR
MS)**

**Identification of flavonoids and tannins in antiviral extract of pitangueira
(*Eugenia uniflora*) leaves by high resolution mass spectrometry (FT-ICR MS)**

Fernanda Mirella Garcia de Oliveira

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2018**

Fernanda Mirella Garcia de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster

Co-orientador(a): Prof. Dr. Wanderson Romão

**VITÓRIA
2018**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura característica dos flavonoides.....	14
FIGURA 2 – Esquema da estrutura do vírus do gênero <i>Alphavirus</i> , família Togaviridae ao qual pertence o MAYV.....	16
FIGURA 3 – Foto de pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i> L.) situada no campus Ufes- Goiabeiras, da qual as amostras de folhas foram coletadas para as análises químicas.....	18
FIGURA 4 – Diferença da coloração de folhas de pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i> L.) no estágio jovem (A) e adulto (B)	19
FIGURA 5 – Flor de pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	19
FIGURA 6 – Frutos em diferentes estágios de maturação.....	20
FIGURA 7 – Estrutura química de eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2.....	21
FIGURA 8 – Estrutura química da oenoteína B.....	21
FIGURA 9 – Estrutura química do Kaempferol, da quercetina e miricetina.....	22
FIGURA 10 – Estrutura química da Galocatequina e miricitrina.....	22
FIGURA 11 – Estrutura química da Rutina.....	22
FIGURA 12 – Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.....	24
FIGURA 13 – Diagrama do método ionização por Eletrospray.....	27
FIGURA 14 – Esquema geral de um sistema de PS-MS.....	29
FIGURA 15 – Esquema geral de um sistema de LS-MS.....	31
FIGURA 16 – Esquema de funcionamento de cela de ICR.....	34
FIGURA 17 – Índice de seletividade e potência relativa à ribavirina das amostras testadas.....	42
FIGURA 18 – Efeito do extrato de <i>Eugenia uniflora</i> na replicação do vírus Mayaro e viabilidade celular – extrato de <i>Eugenia uniflora</i>	42
FIGURA 19 – Espectro (-)-ESI-FT-ICR MS da amostra LLEacet.....	45
FIGURA 20 – ESI(-)MS/MS para os íons <i>m/z</i> (a) 447, (b) 449, (c) 463, (d) 483, (e) 499, (f) 615, and (g) 633.	47
FIGURA 21 – Proposta de fragmentação para flavonoides glicosilados presentes em folhas de <i>Eugenia uniflora</i>	47
FIGURA 22 – Dissociação Induzida por Colisão (CID) de agregados (clusters) de cloreto flavonoídicos.....	48

FIGURA 23 – Proposta de fragmentação dos íons $[M-H]^-$ 169 e 183 do ácido gálico e O-metilgálico.....	49
FIGURA 24 – Espectros de massa ESI(-) de (a) diclorometano (LLE_{dicl}), (b) acetato (LLE_{acet}), (c) água (LLE_{wat}), (d) diclorometano (SE_{dicl}), (e) acetato (SE_{acet}) e (f) frações de metanol (SE_{met}).....	51
FIGURA 25 – ESI(-)FT-ICR MS das frações (a) LLE_{acet} , e (c) SE_{acet} , e PS(-)FT-ICR MS das frações (b) LLE_{acet} , e (d) SE_{acet}	54
FIGURA 26 – Comparação dos valores de IR de ácidos fenólicos e flavonoides obtidos a partir da fração acetato de etila pelas fontes ESI(-) e PS(-).....	55
FIGURA 27 – (-)-LS-FT-ICR-MS de folhas adultas de <i>E. uniflora</i>	56
FIGURA 27a – Expansão do espectro (-)-LS-FT-ICR-MS revelando a Miricitrina (463) e seu cluster (499)	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação de compostos fenólicos conforme o tipo de cadeia do esqueleto básico.....	14
TABELA 2 – Exemplos de analisadores utilizados em MS.....	32
TABELA 3 – Atividade antiviral das frações do extrato de <i>Eugenia uniflora</i>	41
TABELA 4 – Compostos fenólicos identificados em LLEacet de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> por ESI(-)FT-ICR MS.....	46
TABELA 5 – Compostos fenólicos identificados em folhas de <i>Eugenia uniflora</i> por ESI(-)MS, PS(-)MS e LS(-)MS.....	53
TABELA 6 – Efeito da lavagem com solvente na intensidade dos sinais de miricitrina e seu cluster presentes em folhas de <i>E. uniflora</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHIKV – Vírus Chikungunya
CRM – Charged residue model
DART – Direct analysis in real time
DBS – Dry blood spot
DENV – Vírus da dengue
DESI – Desorption electrospray
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EASI – Easy ambient sonic-spray ionization
EI – Eletron ionization
ESI – Eletrospray ionization
FLU-A – Vírus influenza A
HSV – Herpes simplex virus
ICR – Ressonância ciclôtrônica de íons
IEM – Ion evaporation mechanism
LLE – Liquid-liquid extraction
LTP – Low-temperature plasma
MAYV – Vírus Mayaro
PIV – Vírus parainfluenza
PSI – Paperspray ionization
RNA – Ácido ribonucleico
RP – Potência relativa
RSV – Vírus Sincicial Respiratório
SE – Solid phase extraction
SI – Índice de seletividade
SUS – Sistema Único de Saúde
UFES – Universidade Federal do Espírito Santo
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
VHA – Vírus da Hepatite A
VHB – Vírus da Hepatite B

LISTA DE SÍMBOLOS

m/z – Razão massa carga

RESUMO

A *Eugenia uniflora* é uma espécie rica em uma variedade de taninos e flavonoides esses compostos possuem diversas atividades biológicas relatadas. Além disso, a infusão de suas folhas é muito utilizada pela população como auxílio no tratamento da febre da dengue. Dessa forma, devido ao fato do vírus Mayaro (MAYV) se assemelhar ao vírus da dengue (DENV), testes biológicos foram realizados na partição acetato de etila do extrato hidroalcoólico da folha *E. uniflora* com a colaboração do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés - UFRJ, de forma que a atividade antiviral dos extratos foi testada e apresentou-se efetiva frente ao MAYV. A partir desses resultados, dois métodos de extração foram comparados, um deles baseado na extração com solvente por sucessiva partição líquido/líquido e o outro na extração por trituração das folhas em sílica seguida por eluição com solventes. Análises por (-)ESI -FT-ICR MS foram utilizadas para traçar o perfil químico das frações obtidas ricas em flavonoides e comparar a eficiência dos métodos extrativos. A eficiência extrativa, a facilidade de identificação dos flavonóides e a determinação qualitativa da miricitrina foram avaliadas por diferentes técnicas em relação à obtenção dos extratos e a análise por FT-ICR-MS em modo negativo acoplado às fontes de ionização eletrospray, paperspray e Leafspray. Diversos flavonoides foram detectados na sua forma desprotonada na região de m/z 400 a 600, e a miricitrina (m/z 463 [$C_{21}H_{19}O_{12}-H$]-) e seu aduto de cloro (m/z 499 [$C_{21}H_{20}O_{12}+Cl$]-) apresentaram sinais mais intensos. Glicosídeos de quercetina como m/z 447 - $C_{21}H_{19}O_{11}$ e m/z , ácido gálico (m/z 169 - $C_7H_5O_5$) e methyl gallate (m/z 183 - $C_8H_7O_5$), precursores de taninos, também foram identificados. O ESI (-) foi a melhor técnica na análise do perfil químico dos extratos e quando associado à extração de solvente por partição líquido/líquido sucessiva apresentou sinais mais intensos para a miricitrina e suas derivadas, enquanto o outro método de extração apresentou maior seletividade na obtenção de miricitrina. Embora as fontes de Leafspray e paperspray tenham como vantagens a facilidade de preparação da amostra e simplicidade de análise, neste caso proporcionaram sinais menos intensos para os compostos de interesse e não identificaram outros compostos já observados pela fonte de ionização por eletrospray.

Palavras-chave: *Eugenia uniflora*. FT-ICR-MS. Atividade antiviral. MAYV.

ABSTRACT

The *Eugenia uniflora* is a species rich in a variety of tannins and flavonoids and these compounds has been reported as several biologic activities. In addition, the infusion of its leaves is widely used by the population as an aid in the treatment of dengue fever. Due to the fact that the Mayaro virus (MAYV) resembles the dengue virus (DENV), biological tests were carried out on the ethyl acetate partition of the hydroalcoholic extract of the *E. uniflora* leaf with the collaboration of the Institute of Microbiology Paulo de Goés - UFRJ, so that the antiviral activity of the extracts was tested and was effective against the MAYV. Two extraction methods were compared, one of them being based on solvent extraction by successive liquid/liquid partition and the other on the extraction based on the crushing of the sheets with silica gel followed by elution with solvents. Analyses by (-)ESI -FT-ICR MS was used to trace the chemical profile of the fractions rich in flavonoids obtained and to compare the efficiency of extraction methods. The extractive efficiency, the ease of identification of flavonoids and the qualitative determination of myricitrin were evaluated by different techniques in regard to obtaining the extracts and the analysis by FT-ICR-MS in negative mode coupled to the sources of ionization electrospray, paperspray and Leafspray. Several flavonoids could be detected in their deprotonated form in the regions of m/z 400 to 600, and myricitrin (m/z 463 [$C_{21}H_{19}O_{12}-H$]-) and its chlorine adduct (m/z 499 [$C_{21}H_{20}O_{12}+Cl$]-) showed more intense signals. Glycosides of quercetin like m/z 447 - $C_{21}H_{19}O_{11}$ and m/z , gallic acid (m/z 169 - $C_7H_5O_5$) and methyl gallate (m/z 183 - $C_8H_7O_5$), tannins precursors, have also been identified. ESI (-) was better able to analyze the chemical profile of the extracts and when associated with solvent extraction by successive liquid/liquid partition showed more intense signals for myricitrin and its derivatives while the other method of extraction showed greater selectivity in obtaining myricitrin. Although the leafspray and paperspray sources have the advantages of ease of sample preparation and simplicity of analysis, in this case they provided less intense signals for the compounds of interest and did not identify other compounds already observed by the electrospray ionization source.

Keyword: *Eugenia uniflora*. FT-ICR-MS. Antiviral activity. MAYV.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	111
1.1 Metabólitos secundários de plantas. Erro! Indicador não definido.	2
1.2 O MAYV: Características e tratamento	Erro! Indicador não definido.
1.3 Características e composição química de <i>Eugenia uniflora</i>	Erro! Indicador não definido.
1.4 Espectrometria de massas	22
1.4.1 Fontes de ionização.....	Erro! Indicador não definido.24
a) Ionização por eletrospray (ESI)	Erro! Indicador não definido.25
b) Ionização por paperspray (PS)	Erro! Indicador não definido.28
c) Ionização por leafspray (LS)	Erro! Indicador não definido.30
1.4.2 Analisadores de massas.....	3
1.4.3 Espectrometria de massas por Ressonância Ciclotrônica de Ions por transformada de Fourier.....	Erro! Indicador não definido.33
2. OBJETIVOS	35
3. METODOLOGIA	36
3.1 Coleta e identificação da planta	36
3.2 Preparo do extrato para os testes antivirais	36
3.3 Preparo das amostras para análises de espectrometria de massas	36
3.4 Análises das amostras por (-)ESI FT-ICR-MS, (-)PS FT-ICR-MS e (-)LS FT-ICR-MS,.....	37
3.5 Experimentos de (-)ESI-FT-ICR-MS/MS	38
3.6 Análise fitoquímica	38
3.7 Células e vírus	Erro! Indicador não definido.
3.8 Ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral . Erro! Indicador não definido.	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41

4.1	Atividade antiviral	Erro! Indicador não definido.	41
4.2	Perfil químico e identificação de compostos fenólicos em fração ativa frente ao vírus mayaro (LLE _{acet}) por ESI(-) e ESI(-)MS/MS	Erro! Indicador não definido.	44
4.3	Distribuição de flavonoides, principalmente miricitrina e seus derivados em extratos obtidos por LLE e SE	Erro! Indicador não definido.	50
4.4	Comparação das técnicas de ionização na obtenção do perfil químico e identificação de Miricitrina	Erro! Indicador não definido.	52
4.4.1	ESI-MS <i>versus</i> PS-MS	Erro! Indicador não definido.	54
4.4.2	LS-MS <i>versus</i> ESI-MS	Erro! Indicador não definido.	55
5.	CONCLUSÃO		59
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		60
	ANEXO		70

1. INTRODUÇÃO

A *Eugenia uniflora*, denominada popularmente como Pitangueira, é uma planta nativa do Brasil pertencente à família *Myrtaceae*, e que pode também ser encontrada em países da América do Sul, tais como Argentina, Paraguai e Uruguai (ROTMAN, 1995; AURICCHIO; BACCHI, 2003; BEZERRA et al., 2004; SANTOS et al., 2015). Vale ressaltar que a pitangueira encontra-se na lista de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), onde essa lista baseia-se em plantas com potencial na produção de produtos ativos (PLANTAS, 2014).

Suas folhas são utilizadas popularmente no tratamento de diversas doenças e sintomas, entre eles no tratamento de inflamações, febre, dores reumáticas (AURICCHIO; BACCHI, 2003) e hipertensão (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999). Também já é conhecido que taninos hidrolisados do extrato de folha de *Eugenia uniflora*, possuem capacidade de inibir a DNA polimerase do vírus Epstein-Barr, vírus esse, que se apresenta intimamente associado a casos de carcinoma nasofaríngeo (LEE et al. 1997; LEE et al., 2000). Além disso, vale ressaltar que a infusão de suas folhas é muito utilizada pela população como auxílio no tratamento da febre da dengue. Dessa forma, devido ao fato do vírus Mayaro (MAYV) se assemelhar ao vírus da dengue (DENV), testes biológicos foram realizados na partição acetato de etila do extrato hidro alcoólico da folha *E. uniflora* com a colaboração do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés - UFRJ, de forma que a atividade antiviral dos extratos foi testada e apresentou-se efetiva frente ao MAYV. Logo, essa atividade deve-se a compostos presentes na fração acetato de etila de suas folhas.

Entre os compostos encontrados nas folhas de *Eugenia uniflora*, podem ser citados os flavonoides e taninos, metabólitos secundários presentes em diversos vegetais, que podem proporcionar atividade antiviral a extratos de *Eugenia uniflora* (DE GROOT; RAUEN, 1998). Os flavonoides e Taninos são amplamente conhecidos por suas atividades biológicas variadas, possuindo também grande potencial antiviral. No caso dos flavonoides, diversos trabalhos atribuem a essa classe, diferentes mecanismos antivirais, sendo citada a capacidade de inibição da replicação e da infecciosidade do vírus alvo estudado, além de sua atividade antiviral frente ao Herpes simplex vírus (HSV) tipo 1 e 2 e atividade anti-HIV (AHMAD et al.,

2015). Também é relatada atividade antiviral para taninos (FUKUCHI et al., 1989; NAKASHIMA et al., 1992; LIU et al., 2016).

Em trabalho anterior flavonoides do grupo quercetina apresentaram atividade antiviral frente ao MAYV, sugerindo que o vírus possui na constituição de seu envelope proteínas que interagem com flavonoides. Já os taninos e demais polifenóis, podem interagir tanto com o envelope que constitui o vírus como também com partículas proteicas presentes na superfície da célula hospedeira (DOS SANTOS et al., 2014).

Já estudos envolvendo polifenóis derivados de *Camellia sinensis* sugerem que taninos condensados são mais ativos frente ao vírus influenza A do que polifenóis monoméricos (YANG et al., 2014). Além disso, taninos condensados ao serem testados anteriormente apresentaram atividade antiviral frente ao vírus influenza A (FLU-A), vírus parainfluenza (PIV) e Vírus Sincicial Respiratório (RSV), inibindo também o crescimento do vírus Herpes simplex 1 e 2 (HSV-1, HSV- 2) e vírus da Hepatite A e B (VHA e VHB). Dessa forma, foi sugerido que os taninos condensados, testados nesse caso, se ligariam ao envelope do vírus, de forma a inibir a penetração do vírus na membrana da célula (DE BRUYNE et al., 1999). Outro fator a ser considerado é que a atividade antiviral frente ao vírus Mayaro, descrita em estudo realizado por Spindola e colaboradores em extrato de *Cassia australis*, também atribui essa atividade a taninos e outros derivados fenólicos (SPINDOLA et al., 2014).

Nesse contexto, é importante considerar que as folhas de *E. uniflora*, além de uma gama de compostos já relatados, possui em sua composição taninos como eugeniflorina D1, eugeniflorina D2, oenoteína B e flavonoides como kaempferol, miricetina, quercetina, galocatequina e miricitrina (CARVALHO, 2013) e outros compostos tais como rutina, ácido cafeico e clorogênico, isoquercetina e luteolina (CUNHA et al., 2016). Dessa forma, todos esses compostos podem proporcionar atividade biológica a extratos de *E. uniflora*.

1.1 Metabólitos secundários de plantas

As plantas possuem duas rotas metabólicas extremamente úteis para a sua

sobrevivência e adaptação, sendo elas caracterizadas como metabolismo primário e metabolismo secundário. O metabolismo primário abrange processos referentes à vida do vegetal, onde são produzidos metabólitos essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, entre eles carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Já o metabolismo secundário abrange metabólitos sintetizados por organelas do vegetal e que auxiliam na fecundidade e sobrevivência da planta. Um importante fator de diferenciação entre os dois tipos de metabólitos é o fato de alguns metabólitos secundários serem exclusivos de grupos específicos de plantas. Isso se deve aos mesmos não estarem distribuídos de forma equivalente pelos diversos grupos taxonômicos (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Os metabólitos secundários são essenciais para a defesa e proteção das plantas, dessa forma, esses metabólitos atuam como auxiliares na proteção contra herbívoros, insetos e infecção microbiana, além de possuírem função na atração de polinizadores e atuarem como agentes alelopáticos (GARCÍA; CARRIL, 2009). Com relação à sua classificação, os metabólitos secundários podem ser divididos em terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos e alcaloides (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Segundo Ribéreau-Gayon (1968), os compostos fenólicos se dividem em polifenóis pouco distribuídos na natureza, largamente distribuídos na natureza ou poliméricos (RIBÉREAU-GAYON, 1968). O grupo dos poliméricos é composto por ligninas e taninos, que são caracterizados por compostos com alto peso molecular podendo ser hidrolisáveis ou condensáveis, sendo que os constituintes monoméricos dos taninos condensados são os flavonoides (BRAVO, 1998; SOARES, 2002). Por fim, no grupo dos compostos fenólicos largamente distribuídos na natureza encontram-se os flavonoides e derivados de ácidos fenólicos (SOARES, 2002).

O grupo dos flavonoides abrange flavonas, flavonóis, antocianidinas entre outros (BRAVO, 1998; SOARES, 2002; SELEEM et al., 2016; AHMAD et al., 2015). O esqueleto básico desse grupo é constituído por dois anéis aromáticos ligados entre si por três carbonos que comumente formam um anel oxigenado (BRAVO, 1998; SELEEM et al., 2016) (Figura 1).

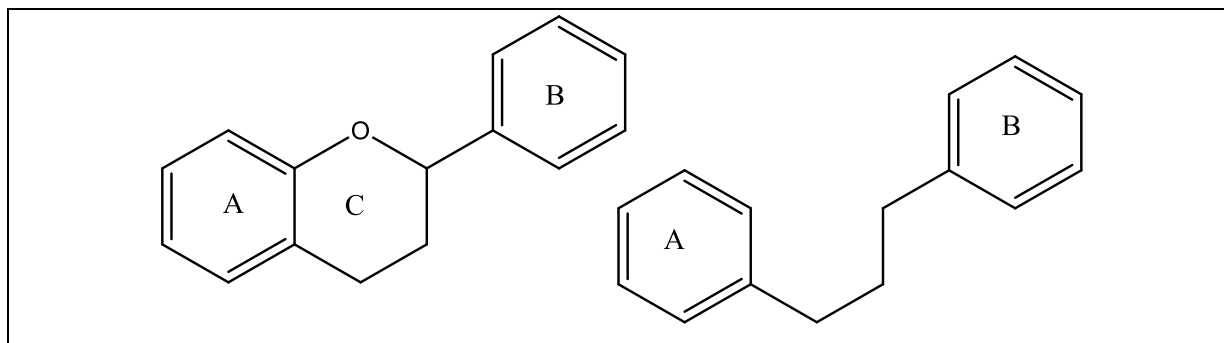


Figura 1. Estrutura característica dos flavonoides

Ainda dentro desse contexto, vale ressaltar que os polifenóis são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas: a via do ácido chiquímico e a via do acetato (GHOSH et al., 2012). Dessa forma os compostos fenólicos são classificados de acordo com o seu esqueleto principal (tabela 1), em que o anel benzênico é representado por C6 e C_n corresponde à cadeia substituinte (SIMÕES et al., 2010).

Tabela 1. Classificação de compostos fenólicos conforme tipo de cadeia do esqueleto básico

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples e benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, Cumarinas, isocumarinas e cromonas.
C6-C4	naftoquinonas
C6-C1-C6	xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos e antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	lignanas
(C6-C3-C6) ₂	biflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Fonte: SIMÕES et al., 2010

1.2 O MAYV: características e tratamento

O MAYV é do gênero *Alphavirus*. A doença causada por ele provoca artralgia de longa duração e sintomas semelhantes ao da dengue, podendo ser confundida com

a febre Chikungunya. O tratamento da febre mayaro consiste basicamente no controle dos sintomas e da desidratação do paciente, pois a doença não possui tratamento específico (WEAVER; REISEN, 2010).

Comumente, os mosquitos do gênero *Haemagogus* atuam como principais vetores do MAYV, porém, em áreas urbanizadas, o *Aedes aegypti* (vetor do vírus da dengue, do zica vírus e do vírus chikungunya) e o *Aedes albopictus* também podem atuar como vetores desse vírus (WEAVER; REISEN, 2010).

A febre Mayaro é uma doença endêmica de áreas florestais e, no Brasil, ela se concentra na região amazônica. Porém, diversos casos envolvendo surtos de febre mayaro foram relatados em outras regiões, tais como Tocantins e Mato Grosso (VASCONCELOS et al., 1998). Além disso, relatos indicam que casos de MAYV também têm ocorrido em outros países devido ao turismo realizado na região amazônica (NEUMAYR et al., 2012). Assim, tomando como exemplo o êxito do DENV no hemisfério ocidental, devemos considerar que, com o aumento nos casos de febre Mayaro em centros urbanos, a possibilidade do MAYV tornar-se endêmico nas regiões urbanas também aumenta (WEAVER; REISEN, 2010).

A importância na busca pelo tratamento da febre mayaro e o controle do MAYV podem e devem ser reconhecidos devido ao fato dela se estender para além da região amazônica. Além disso, por pertencer ao gênero *Alphavirus*, o MAYV possui potencialidade de atuar nesse cenário como um modelo a ser estudado devido à sua semelhança com outros vírus tais como o vírus Chikungunya (CHIKV) que apresentou um aumento em sua propagação nos últimos anos (FISCHER et al., 2013; SCHAFFNER et al., 2013; KAMPEN; WERNER, 2014).

Considerando que atualmente a maioria dos antivirais disponíveis para a utilização pública são relacionados ao HIV, Herpes e a um pequeno número de outras viroses (YASUHARA-BELL; YUANAN, 2010), outros vírus tais como DENV, MAYV E CHIKV ainda não possuem um antiviral padronizado disponível para uso público. Logo, sendo os produtos naturais fonte potencial de novas substâncias de baixa toxicidade e alta seletividade antiviral, ocorre atualmente um aumento nos esforços de investigação para exploração desse potencial (NEWMAN; CRAGG, 2012). Além disso, devido a sua baixa citotoxicidade, à rápida degradação no meio

ambiente e a sua complexidade química, fatores esses, que devem limitar a resistência e aumentar sua aplicabilidade de uso, os produtos naturais, quando comparados a moléculas sintéticas, são considerados mais atraentes para estudo (POLITI et al., 2012; GEORGE et al., 2014).

Nesse contexto, vale ressaltar que alguns metabólitos secundários de plantas, são amplamente conhecidos por suas diversas atividades biológicas entre elas o seu potencial antiviral. No caso dos flavonoides, diversos trabalhos atribuem à essa classe de metabólitos, diferentes mecanismos antivirais, de forma que, foram citados a capacidade de inibição da replicação e da infecciosidade de acordo com o vírus alvo estudado (NIJVELDT et al., 2001).

Uma vez que os vírus podem possuir diferentes tipos de proteína em sua estrutura, de acordo com seu tipo, a interação entre ele e moléculas de polifenóis ocorrerá de formas diferentes de acordo com sua constituição. Assim, vírus possuem uma estrutura básica, que é constituída por um tipo de ácido nucléico, que pode ser RNA ou DNA, envolvido por um capsídeo. Recobrando o capsídeo encontra-se o envelope, constituído basicamente por uma bicamada lipídica com carboidratos e proteínas (Figura 2). Vale ressaltar que, o envelope não é observado em todos os vírus (GELDERBLOM, 1996).

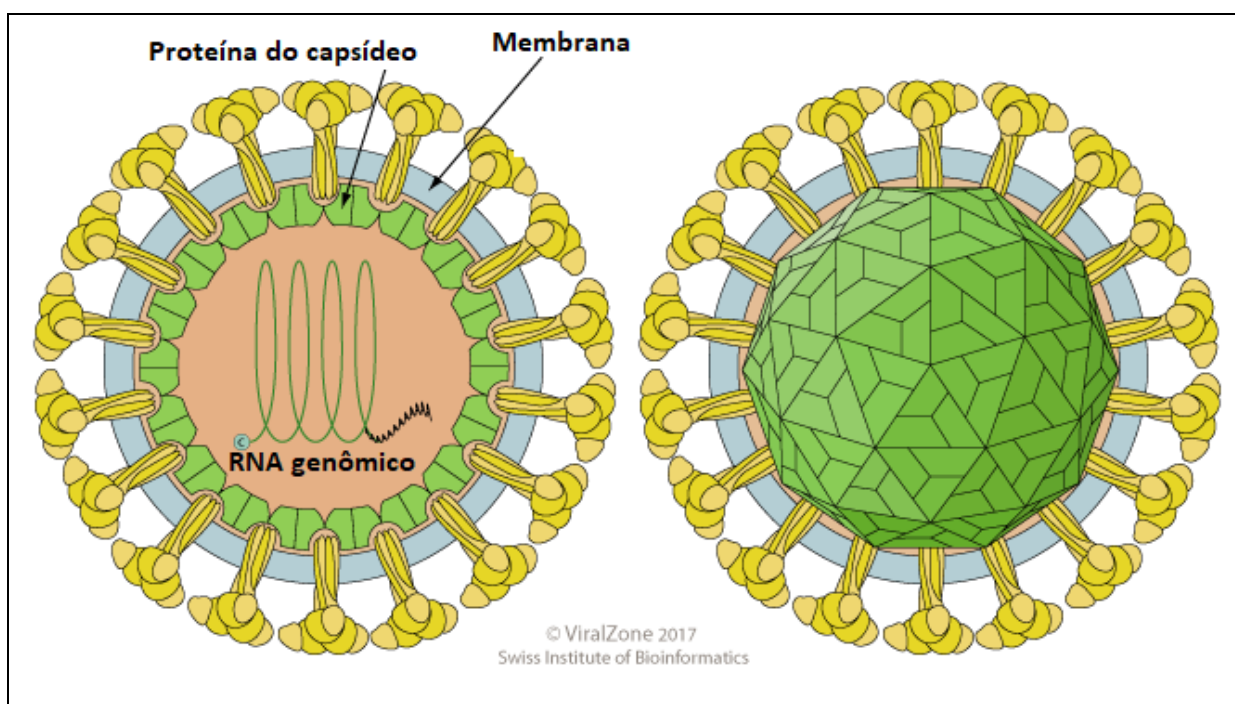


Figura 2. Esquema da estrutura do vírus do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae* ao qual pertence o MAYV (adaptado de <http://viralzone.expasy.org/>).

Segundo sugestões de trabalho anterior, o vírus Mayaro possui na constituição de seu envelope proteínas que interagem com flavonoides, devido ao fato dos flavonoides do grupo quercetina terem apresentado atividade antiviral relativo ao vírus Mayaro. Já taninos e demais polifenóis, podem interagir tanto com o envelope que constitui o vírus como também com partículas proteicas presentes na superfície da célula hospedeira (DOS SANTOS et al., 2014).

1.3 Características e composição química de *Eugenia uniflora*

No que diz respeito às características botânicas da espécie estudada, é conhecido que, a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma planta perene arbustiva, de frutos comestíveis, pertencente à família Myrtaceae (AURICCHIO; BACCHI, 2003; BEZERRA et al., 2004; SANTOS et al., 2015).

Essa espécie (*Eugenia uniflora* L.) possui diversas denominações, sendo elas variáveis de acordo com sua localidade. Entre essas denominações podemos citar as mais comuns em países de língua inglesa (Brazil cherry, Surinam cherry, Cayenne cherry, Florida cherry e pitanga) e de língua francesa (cerisier de Cayenne e cerisier de Surinam) (LIRA JUNIOR et al., 2007). A *Eugenia uniflora* L. é uma planta nativa do Brasil, sendo também comumente encontrada em países da América do Sul, tais como Argentina, Paraguai e Uruguai (ROTMAN, 1995). Atualmente é cultivada na América Central, Caribe, áreas tropicais dos Estados Unidos, China, Índia, sudeste da Ásia, Sri Lanka, Madagascar, África do Sul, Israel e alguns países do Mediterrâneo (BEZERRA et al., 2004; SANTOS et al., 2015).

Eugenia uniflora L. é uma planta que se adapta bem em diversos tipos de solo tais como solos arenosos, areno-argilosos, argilo-arenosos e pedregosos, porém, apresenta-se suscetível à salinidade (MORTON, 1987; LIRA JUNIOR et al., 2007).

Apesar disso, diversos fatores, tais como a variação das condições climáticas, condições do solo e oferta de nutrientes influenciam nas épocas de florescimento e frutificação da pitangueira, sendo que nas regiões Sul e Sudeste brasileiro a floração e a frutificação podem ocorrer duas ou mais vezes no ano. O período de floração nessas regiões abrange desde agosto a dezembro, podendo também abranger de fevereiro a julho. Já a frutificação abrange os meses entre agosto e fevereiro,

ocorrendo também entre abril e julho em alguns casos (LIRA JUNIOR et al., 2007).

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pode ser caracterizada como um arbusto denso e ramificado. Sua altura é variável atingindo na maioria das vezes de 2 a 4 metros, porém pode atingir de 6 a 9 metros de altura em condições de solo e nutrientes apropriados. Sua copa possui formato arredondado e pode apresentar de 3 a 6 metros de diâmetro (Figura 3) (LIRA JUNIOR et al., 2007; MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

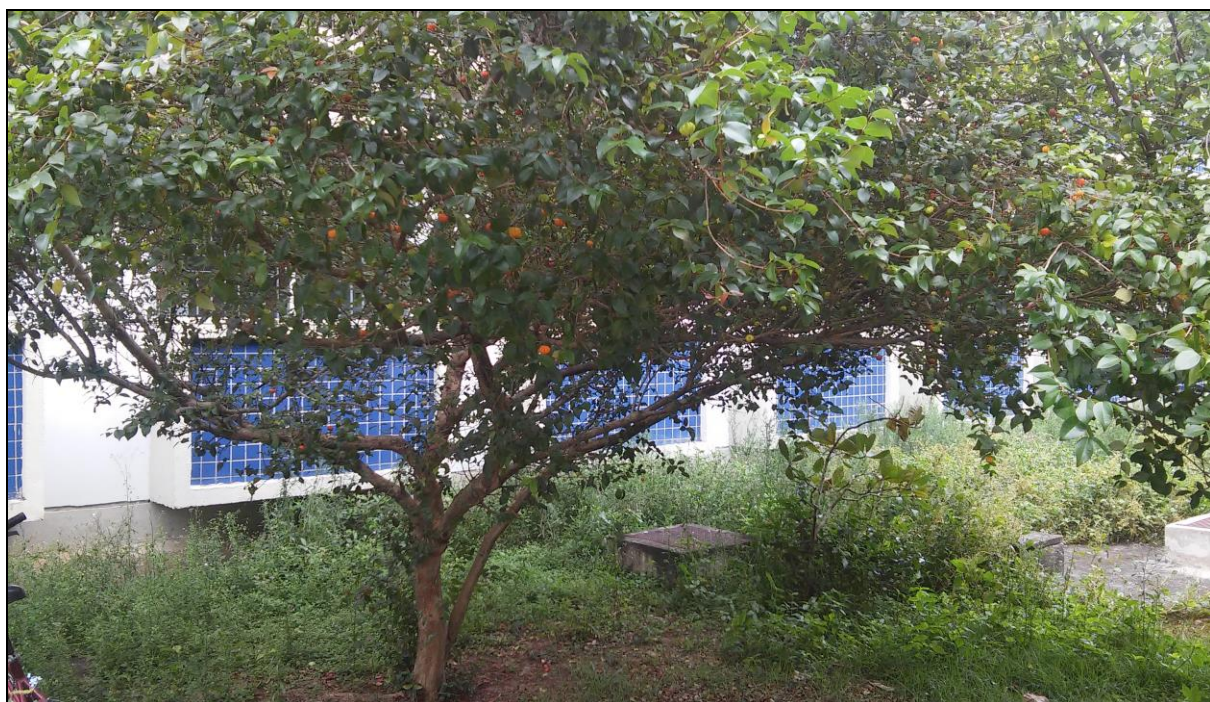


Figura 3. Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) situada no campus Ufes- Goiabeiras, da qual as amostras de folhas foram coletadas para as análises químicas.

Eugenia uniflora L. possui uma folhagem persistente ou semidecídua, suas folhas apresentam coloração verde-amarronzada quando jovens (Figura 4A) e verde escura quando adultas (Figura 4B). Referente a consistência das folhas, elas se mostram membranáceas quando jovens e subcoriácea quando adultas (LIRA JUNIOR et al., 2007).



Figura 4. Diferença da coloração de folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) no estágio jovem (A) e adulto (B) (adaptado de LIRA JUNIOR et al., 2007).

Suas flores produzem pouco ou nenhum néctar apesar de serem melíferas e suavemente perfumadas, seu cálice é composto por 4 sépalas e sua corola é formada por 4 pétalas, livres, de coloração branco-creme (Figura 5). Elas possuem dezenas de estames, suas anteras possuem coloração amarelada e são abundantes em pólen, e seus estiletes possuem coloração branca (LIRA JUNIOR et al., 2007).



Figura 5. Flor de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

A pitanga é classificada como uma baga globular com achatamento nos pólos coroada com sépalas persistentes, e pode possuir de 7 a 10 sulcos proveniente de sete a dez ranhuras longitudinais. Seu tamanho pode variar de 1.5 a 5.0 cm de diâmetro (MORTON, 1987; LIRA JUNIOR et al., 2007).

Durante o processo de maturação do fruto o epicarpo muda de coloração desde

o verde para o amarelo e passando pelo alaranjado até atingir o vermelho- escuro sendo que em alguns casos o fruto pode atingir uma coloração quase negra (Figura 6). A coloração do endocarpo varia de rósea a vermelha e sua espessura pode variar de 3 a 5 mm, sendo que o sabor da polpa da pitanga é doce e de característica ácida possuindo também um aroma intenso e característico (MORTON,1987).



Figura 6. Frutos em diferentes estágios de maturação (LIRA JUNIOR et al., 2007).

Referente à composição química das folhas de *E. uniflora*, pode-se destacar uma gama de substâncias já identificadas. Entre estas, taninos como eugeniflorina D1, eugeniflorina D2 (Figura 7) e oenoteína B (Figura 8) (LEE et al., 1997; LEE et al., 2000), antraquinonas, terpenóides tais como monoterpenos, triterpenos e 13 sesquiterpenos (ALICE et al., 1991; WAZLAWIK et al., 1997; EMBRAPA, 2006). Além disso, os flavonóides kaempferol, miricetina, quercetina (Figura 9), galocatequina e miricitrina também podem estar presentes (Figura 10) (LEE et al., 1997; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987; EMBRAPA, 2006).

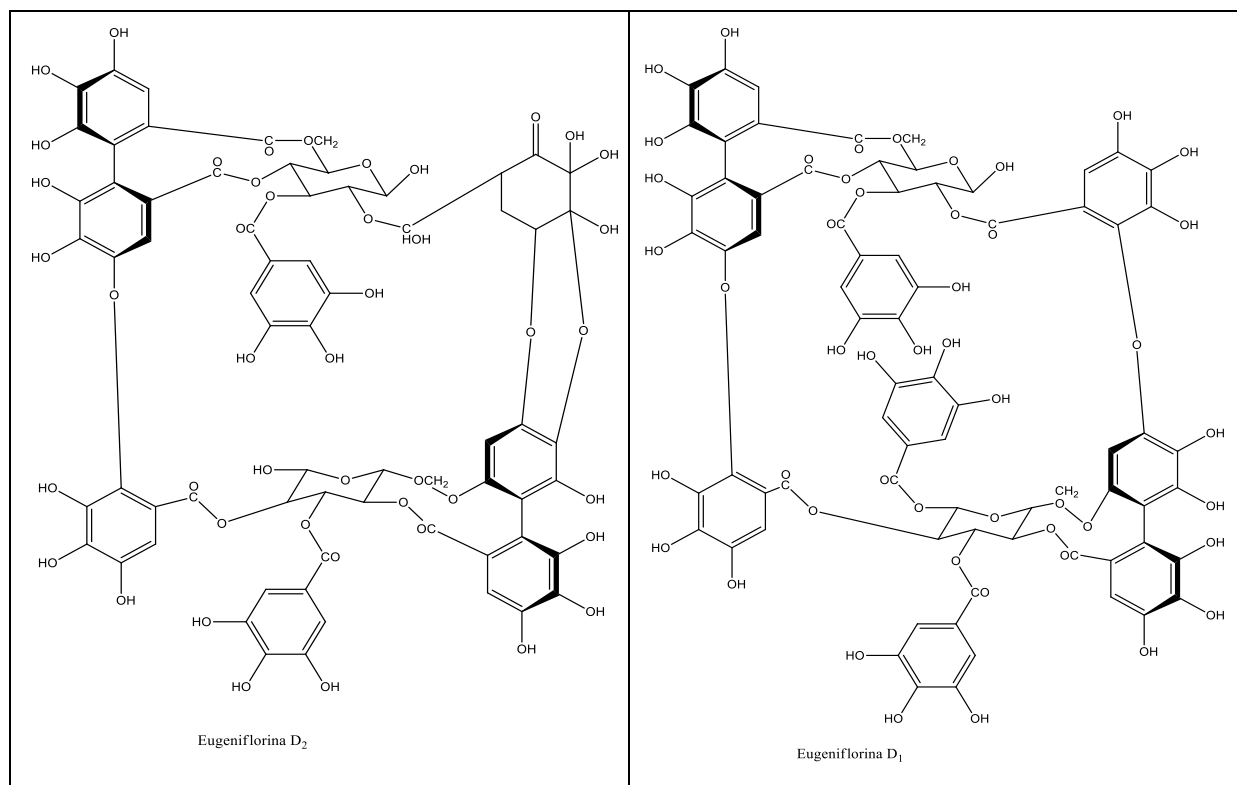


Figura 7. Estrutura química de eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2

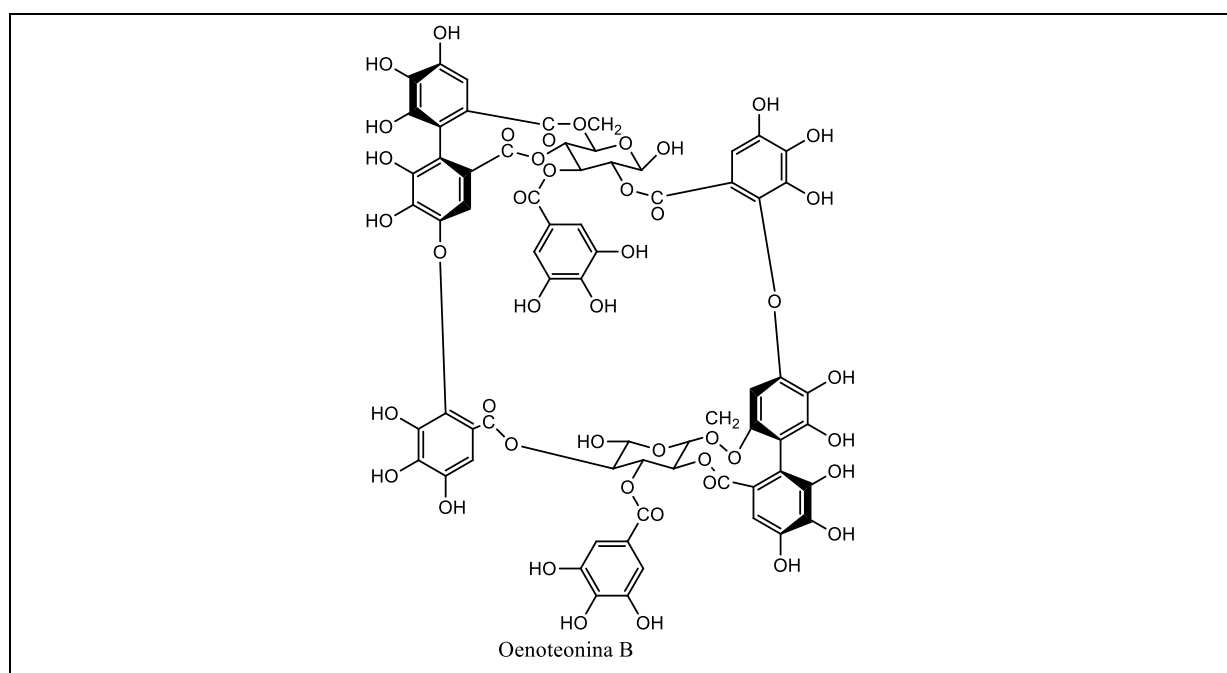


Figura 8. Estrutura química da oenoteína B

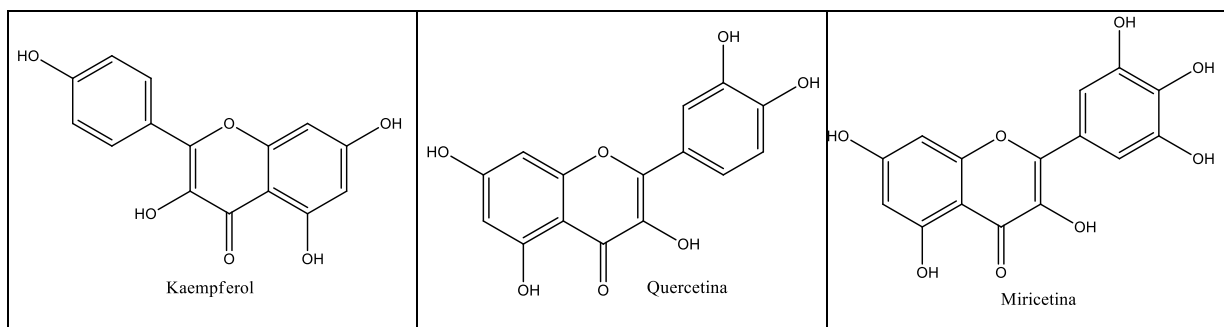


Figura 9. Estrutura química do Kaempferol, da quercetina e miricetina.

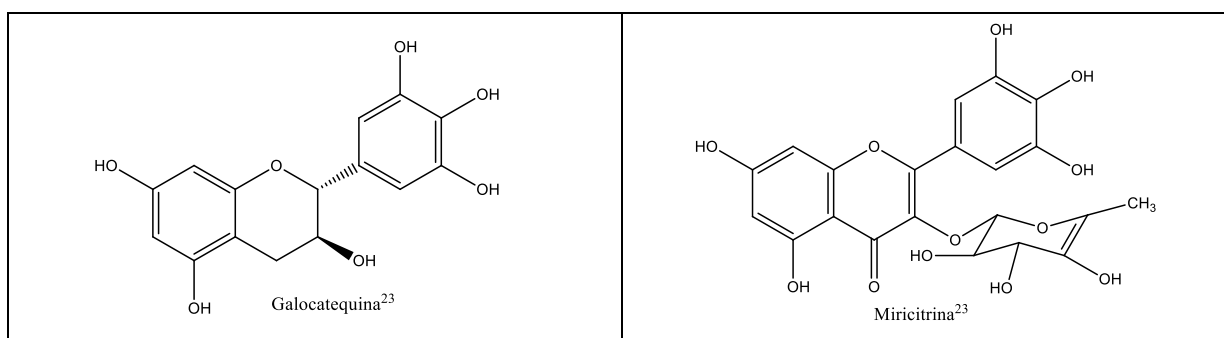


Figura 10. Estrutura química da Galocatequina e miricitrina

Vale ressaltar que, a quercetina 3-O-rutinosídeo (rutina) (Figura 11), quercetina 3-O hexosídeo, quercetina 3-O-pentosídeo são formas estruturais da quercetina que coexistem na constituição das folhas e frutos de *E. uniflora* (ERLUND, 2004). Além desses compostos, diversos outros já foram relatados como presentes em folhas de *E. uniflora* (Anexo 01).

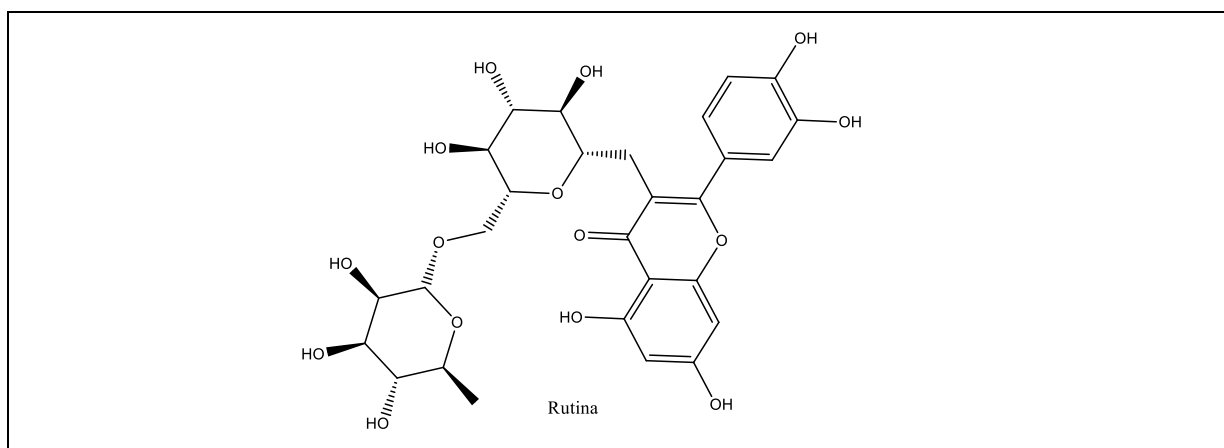


Figura 11. Estrutura química da Rutina

1.4 Espectrometria de massas

Entre diversas características da espectrometria de massas está a sua capacidade de gerar informações essenciais para análises químicas de uma forma facilitada.

Entre estas informações está a massa molar e as características do composto de interesse. Essa técnica é uma ferramenta de análise muito utilizada para a identificação de metabólitos secundários de plantas (LIN; HARNLY, 2010; PLESSI et al, 2006; JAISWAL et al, 2014) pois fornece a exatidão de massas, composição elementar, perfil isotópico e a estrutura molecular de cada composição química de interesse. Por fim, a técnica também permite que sejam obtidas informações relacionadas à quantificação da amostra estudada (DALMASCHIO, 2012).

Vale ressaltar que, a espectrometria de massas, quando comparada as outras técnicas analíticas, cresceu de forma acentuada no meio científico de forma que, a mesma destaca-se. Isso pode ser associado as suas características vantajosas, tais como velocidade de análise, sua altíssima seletividade e sua diversidade de aplicação além de uma sensibilidade inigualável (HOFFMAN; STROOBANT, 2007; FIGUEIREDO, 2010; DALMASCHIO, 2012).

A técnica empregada na espectrometria de massas consiste na ionização e separação de moléculas ou átomos de acordo com sua razão massa carga (m/z) sendo m a massa em u e z a carga formal. Dessa forma, a técnica produz o detalhamento de informações como a discriminação e quantidade de íons gerados em uma relação m/z determinada (NETO, 2010; DALMASCHIO, 2012).

Vale ressaltar que apesar da maioria dos sinais possuírem carga $1+$ sendo a sua relação m/z igual à massa do íon, podem ocorrer situações em que é registrada $\frac{1}{2}$ da razão m/z . Nesses casos, principalmente envolvendo peptídeos ou proteínas, ocorrem devido à formação de espécies multicarregadas, onde o valor de m/z detectado é reduzido de acordo com o número de cargas (HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

Espectrômetros de massas são constituídos basicamente pelo sistema de introdução de amostra, pela fonte de ionização (que pode trabalhar a pressão de 10-6mbar ou pressão atmosférica) seguida pelo analisador de massas (responsável pela qualidade e resolução do sinal) e o detector, que quantifica os íons e transforma o 16 sinal, que é processado e convertido em função da razão m/z , gerando um espectro de massas correspondente a amostra analisada (Figura 12) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; ROMÃO, 2010).

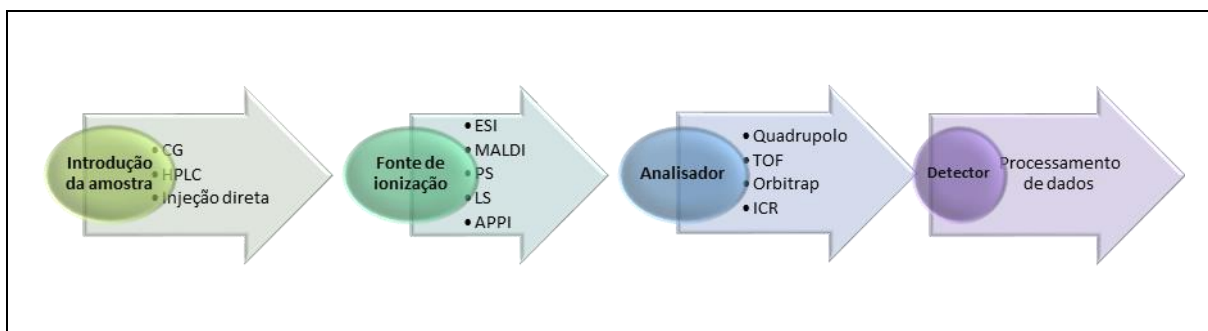


Figura 12. Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas

Outro conceito importante no que se diz respeito à análise de espectros de massas, é que átomos ou moléculas neutras não são analisados, apenas espécies iônicas. Primeiramente, para que ocorra a análise dos íons, deve ser considerado o processo pelo qual ele é gerado. Esse processo utiliza um sistema de ionização ou uma fonte de íons. Logo, vale ressaltar que a fonte de ionização e o analisador são componentes de extrema importância na composição de um espectrômetro de massa. Isso pode ser justificado pelo fato de que cada tipo de ionizador possui uma característica específica de ionização que se aplica a determinado tipo de composto. Dessa forma, as formas de ionização e o analisador de massa que vão determinar a aplicabilidade da técnica (ROMÃO, 2010; GHISLAIN; FAURE; MICHELS, 2012).

1.4.1 Fontes de ionização

Dentre as fontes de ionização existentes, podem ser citadas a fonte de ionização por elétrons (EI) que é muito utilizada na ionização de moléculas apolares e voláteis e a fonte de ionização por eletrospray (ESI) muito utilizada em moléculas polares e de alta massa molar. Também podem ser citadas técnicas de ionização ambiente que possuem como características principais a velocidade de análise, a análise direta e com alto rendimento. Entre estas podem ser citadas o paper spray (PS) que facilita a introdução da amostra no espectrômetro, desorption electrospray (DESI), easy ambient sonic-spray ionization (EASI) e direct analysis in real time (DART), entre outras (ROMÃO, 2010; HUANG et al., 2011).

As fontes de ionização são equipamentos com a capacidade de produzir íons em fase gasosa a partir da amostra de interesse assim como também a partir de espécies iônicas presentes em solução. Nesse contexto, a definição da fonte de ionização a ser utilizada ocorre de acordo com o analito em que se deseja analisar,

visto que cada fonte por possuir um método específico de ionização, possui maior eficiência em um grupo específico de compostos (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Devido a crescente busca por análises cada vez mais facilitadas e eficientes, novas técnicas de ionização tem sido implementadas, onde essas novas técnicas incluem a geração de íons em condições ambientes para que possam posteriormente ser analisados por espectrometria de massas. Logo, os métodos de ionização ambiente revelam-se uma saída e despertam interesse de aplicação tanto acadêmico quanto industrial, visto que as fontes de ionização que utilizam esse método apresentam simplicidade quando comparadas as que utilizam de um alto vácuo (COOKS, 2006; HUANG et al., 2011; TOSATO, 2016).

Essas fontes que funcionam em condição ambiente inicialmente foram relatadas no ano de 2004 (DESI e DART), e com o passar dos anos, outras fontes foram criadas e modificadas (VENTER; NEFLIU; COOKS, 2008).

O princípio que envolve as fontes ambientes é a aplicação da amostra a ser analisada não tratada ou minimamente tratada diretamente no local de análise em condições atmosféricas, sendo que dessa forma a amostra pode estar em qualquer estado, tanto sólida quanto líquida e gasosa (ALBERICI et al., 2010; CAJKA et al., 2011; DI STEFANO et al., 2012; SHEN et al., 2013; ZHANG; LIU; ZHENG, 2014; KILL, 2016)

Além disso, vale ressaltar que essas fontes apresentam diversas vantagens de análise, entre estas a especificidade química, a velocidade, a possibilidade de análises envolvendo MS/MS e os baixos limites de detecção (COOKS, 2006). Entre essas fontes podem citadas desorption electrospray (DESI), direct analysis in real time (DART), low-temperature plasma (LTP), electrospray ionization (ESI) e paper spray ionization (PSI) (ZHANG; LIU; ZHENG, 2014; KILL, 2016)

a) Ionização por eletrospray (ESI)

O desenvolvimento inicial do método que se baseia no acoplamento de uma fonte de ionização por eletrospray a um espectrômetro de massas, no ano de 1984, deve-se a Yamashita e Fenn (KRAJ et al., 2008). Esse método é baseado na nebulização da solução ou amostra, com o objetivo de gerar uma pulverização de gotículas que permitem que o solvente da amostra seja evaporado e que íons

moleculares em fase gasosa a pressão ambiente sejam produzidos e encaminhados para o interior do analisador (COOKS, 2006; KILL, 2016).

De forma mais detalhada, a ionização por eletrospray ocorre através de um sistema onde um solvente volátil, um solvente orgânico como a acetonitrila e o metanol, é adicionado na amostra a ser analisada. Posteriormente, a mesma é transportada por um tubo capilar submetido a um potencial elétrico que varia de 2 a 5Kv sobre pressão atmosférica com um fluxo de 1 a 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Vale ressaltar que, o potencial aplicado no capilar pode ser positivo ou negativo dependendo do objetivo da análise.

Dessa forma, devido ao alto potencial aplicado, ocorre a formação de gotas enriquecidas de íons positivos ou negativos no final do capilar que se deformam gerando o cone de Taylor devido a influencia do campo elétrico. Após isso, com a injeção de um gás coaxialmente que permite a dispersão dessas gotas, as mesmas são arrastadas através de um fluxo de gás nitrogênio aquecido a fim de que seu tamanho seja reduzido e sua carga por unidade de volume aumente com a evaporação do solvente (HOFFMAN; STROOBANT, 2007; KRAJ et al., 2008; DALMASCHIO, 2012; KILL, 2016).

Por fim, são gerados íons protonados e desprotonados para o analisador devido á explosão coulômbica, que ocorre nesse caso devido à diminuição contínua do tamanho das gotículas geradas e o aumento exacerbado do campo elétrico presente na superfície (Figura 13) (HOFFMAN; STROOBANT, 2007; ROMÃO, 2010; KILL, 2016).

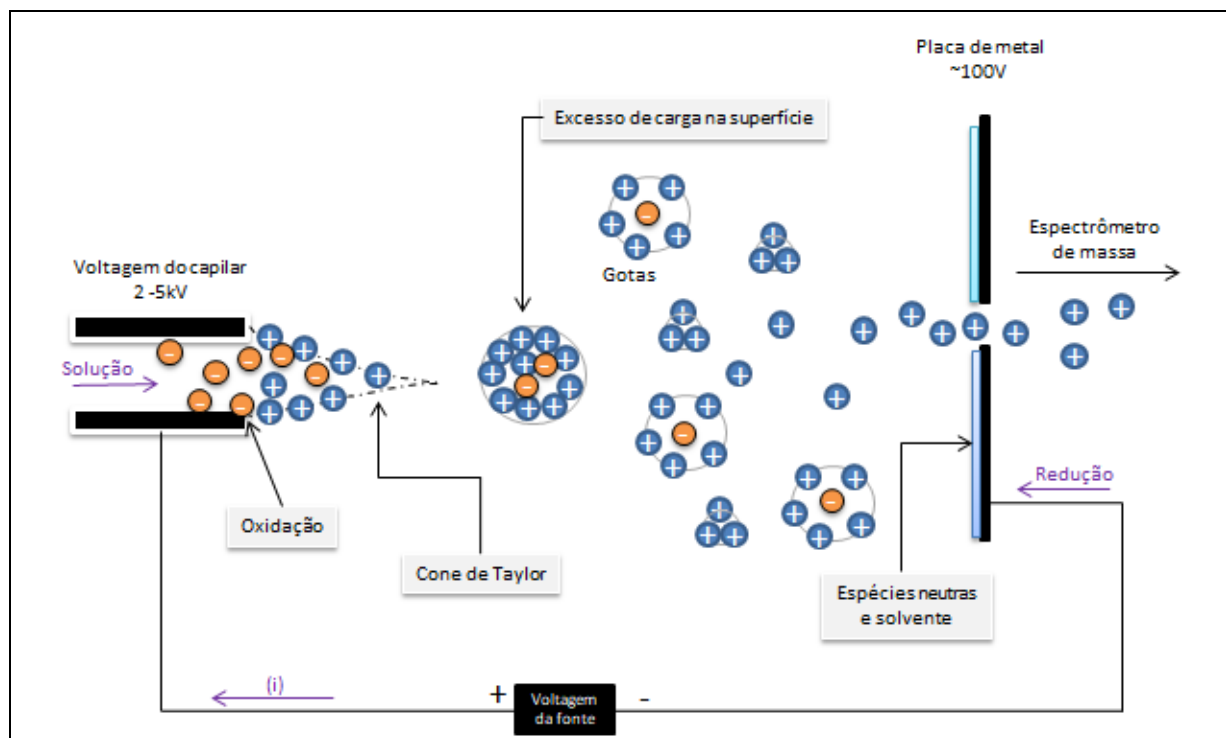


Figura 13. Diagrama do método ionização por Eletrospray.

No que diz respeito aos compostos que podem ser analisados pela fonte ESI, pode-se destacar que a mesma permite que compostos não voláteis antes não detectáveis sejam caracterizados devido a sua capacidade de ionizar moléculas de maneira branda e eficiente (SANTOS, 2011). Tanto polímeros, que são macromoléculas, como pequenas espécies orgânicas ou inorgânicas podem ser ionizadas por ESI (KEBARLE; VERKERK, 2000).

Vale ressaltar que em alguns casos é necessária também a adição de ácido fórmico ou acético (no modo positivo de ionização) e a adição de solução de amônia ou uma imina volátil (no modo negativo de ionização) a fim de que a protonação (no caso do modo positivo) ou desprotonação (no caso do modo negativo) sejam facilitadas (KRAJ et al., 2008).

Por fim, a particularidade dessa técnica é o fato de que a mesma é capaz de gerar em uma faixa reduzida de razão massa carga uma distribuição de íons multiplamente carregados, além da mesma ser uma técnica de ionização branda, o que permite a análise de misturas complexas em uma etapa por não fornecer muitas fragmentações de íons moleculares apesar de manterem a elevada carga dos íons moleculares, o que favorece a colisão induzida por dissociação (KRAJ et al., 2008;

CORILO, 2011; KILL, 2016).

Outros fatores que tornam a fonte ESI bastante vantajosa são seus custos relativamente baixos no que diz respeito ao equipamento, facilidade de operação e seletividade na análise de matrizes complexas no que diz respeito á compostos polares. Dessa forma, essa fonte de ionização quando acoplada a um analisador FT-ICR-MS torna possível a análise de matrizes complexas de forma direta e permitindo a caracterização da mesma e identificação de até 20000 compostos em uma análise (SHI et al., 2010; FREITAS et al., 2013).

b) Ionização por paperspray (PS)

No que diz respeito á criação da fonte de ionização PS, é conhecido que sua criação ocorreu por meio do grupo do professor Dr. R. G. Cooks no ano de 2010. Esse método de ionização é considerado relativamente rápido, exato e de baixo custo, o que possibilita a análise de aproximadamente 400 amostras (WANG et al., 2013; CARVALHO, 2015). Além disso, esse método revelou-se eficaz e reprodutível em diversos tipos de análises, podendo ser citadas análises em tecidos biológicos (HU et al., 2012) e em Dry blood spot (DBS) (WANG et al., 2013), na determinação de fármacos diretamente do sangue em 45 segundos (WANG et al., 2013), proteínas (ZHANG, JU, et al., 2014), e no acompanhamento de reações químicas (CODY; DANE, 2014).

Porém, deve ser considerado que essa fonte de ionização possui as mesmas restrições que a fonte de ionização por eletrospray possui, visto a sua capacidade de ionização de classes de compostos específicos. Ou seja, o Paper Spray possui dificuldade em ionizar substâncias com alta polaridade, que interagem fortemente com o papel utilizado, e em ionizar substâncias apolares (WAGNER, TONOLI, et al., 2014). Entretanto solventes apolares, entre estes hexano e tolueno, já foram testados em PS a fim de aumentar a sua aplicação, verificando que com estes existe a formação de íons (CHAIT, 1972; LI, WANG, et al., 2011).

Essa técnica de ionização é essencialmente baseada na técnica de ESI e constitui-se em uma garra de jacaré, fixada a um suporte por uma garra e soldada a um fio, o que permite que um papel em formato triangular seja submetido a uma alta voltagem que varia de 3 a 5 Kv. Logo, a amostra que é depositada no centro do

papel, se espalha pela superfície do mesmo por meio de capilaridade e com isso chega as extremidades do papel. Assim, a voltagem que é aplicada no papel gera um campo elétrico que induz a formação de um spray em formação e um cone de Taylor (Figura 14) (LIU, WANG, et al., 2010; YANG et al., 2012; CARVALHO, 2015).

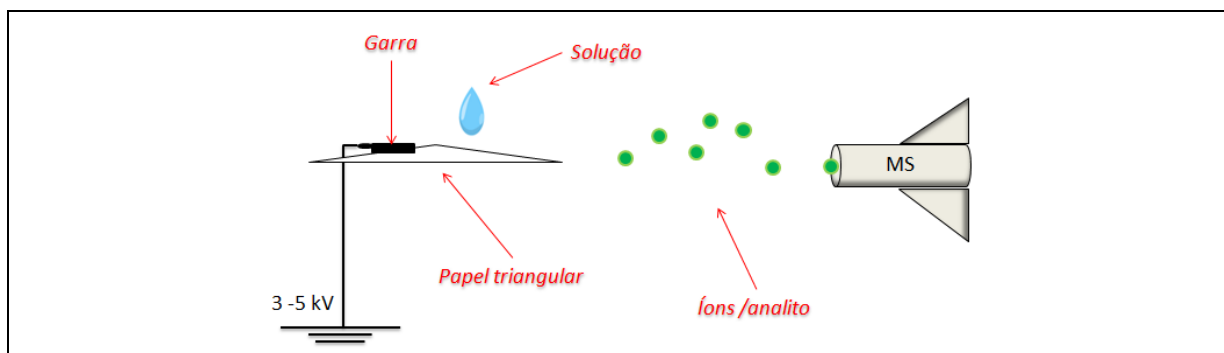


Figura 14. Esquema geral de um sistema de PS-MS

No mecanismo do PS, os analitos são dessolvatados durante a formação do spray devido a ação capilar existente na superfície porosa do papel, o que proporciona a possibilidade dos analitos se movimentarem para a ponta do papel. Logo, é possível a dessorção do analito em forma de íon através do papel (YANG et al., 2012; CARVALHO, 2015).

De forma mais detalhada, a ionização por Paper Spray ocorre através de um sistema que possui os mesmos princípios do ESI, onde um spray eletrolítico sob pressão atmosférica incide sobre a amostra acidificada ou basificada. Com isso, na presença do alto campo elétrico, o cone de Taylor é formado e gotas com excesso de carga negativa ou positiva são geradas devido a oxidação do contra-íon. Logo após essas gotas se subdividem devido à evaporação do solvente. Podem ser formados com isso as CRM (charged residue model) ou ocorrer um IEM (ion evaporation mechanism), onde no primeiro caso são formadas gotas com apenas um íon e no segundo caso os íons presentes nas gotas evaporam para a fase gasosa, apesar de que todos esses processos ocorrem em escala nano (FENN, 2002; YANG et al., 2012; CARVALHO, 2015).

No que diz respeito à sensibilidade da técnica, tem-se que a mesma aumenta quando a análise é realizada após a secagem da amostra no papel, visto que ao realizar a análise logo após a introdução da amostra no papel a sensibilidade diminui

devido ao fato do analito por capilaridade mover-se para a ponta do papel. Também podem ser citados outros fatores que estão diretamente ligados ao limite de detecção e a sensibilidade da técnica, entre eles estão a voltagem aplicada ao papel, a intensidade de corrente iônica total, o posicionamento do papel em relação ao MS Inlet e o ângulo da ponta do papel triangular (LIU; SNAPP; JI, 2011; YANG et al., 2012; CARVALHO, 2015).

Dessa forma referente ao ângulo em que a ponta do papel deve ser posicionada, deve-se levar em consideração o fato da intensidade da corrente iônica total diminuir e com isso o diâmetro do cone de Taylor diminuir causando a diminuição na quantidade de íons que são encaminhados para a análise no espectrômetro de massas quando ocorre o aumento do ângulo da ponta do papel.

Nota-se que a voltagem também é um fator de extrema importância, visto que se a mesma diminuir o cone de Taylor produzido também tem o diâmetro diminuído. Além disso, a distância do papel em relação ao MS Inlet deve ser considerada, visto que com o aumento excessivo dessa distância ocorre perda por evaporação devido ao aumento da distância percorrida pelos íons (YANG et al., 2012; CARVALHO, 2015).

c) Ionização por leaf spray (LS)

O método de ionização LS é uma técnica variante ao PS e relativamente recente que foi desenvolvida por Zhang e colaboradores. Essa técnica, assim como o PS, apresenta velocidade de análise e o pouco preparo ou nenhum da amostra a ser analisada como vantagens principais (ROMÃO; BONIEK et al., 2016). Além disso, vale ressaltar que essa técnica pode ser utilizada para diversas finalidades, como por exemplo, na análise e comparação de metabolitos de plantas (MULLER; COOKS, 2014) e quantificação de pesticidas em amostras (MALAJ et al., 2012) entre outras aplicações (ROMÃO; BONIEK et al., 2016).

O PS se baseia na análise direta do analito em sua matriz nativa de forma que o mesmo dispensa a transferência da amostra para o papel ou o preparo de extratos e soluções. O Leaf Spray funciona de modo similar ao PS, porém a alta voltagem é aplicada diretamente na folha da planta a ser analisada ao invés de ser aplicada no papel triangular com as amostras, de forma a gerar íons em fase gasosa (ZHANG,

LI, et al., 2012; CARVALHO, 2015). Os sinais podem ser identificados quando ocorre a análise sem adição de solvente, entretanto, é conhecido que sinais mais intensos e melhores são obtidos quando é realizada a adição de solvente na folha analisada (MALAJ et al., 2012; ROMÃO; BONIEK et al., 2016).

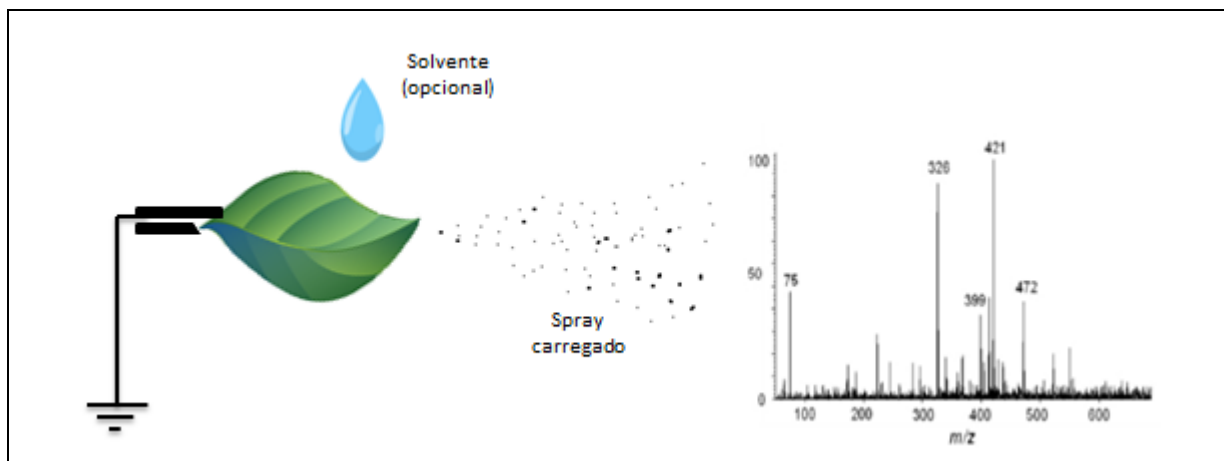


Figura 15. Esquema geral de um sistema de LS-MS

1.4.2 Analisadores de massas

Dentre os componentes de um espectrômetro de massas o analisador de massas é o que possui como função a separação dos íons detectados de acordo com os valores de sua razão massa carga (m/z) (KRAJ et al., 2008; KILL, 2016; OGAWA, 2016).

Os analisadores são classificados de acordo com sua forma de funcionamento e forma de separação dos íons. A maioria dos analisadores atuais se baseia no eletromagnetismo, entretanto sua análise pode ser pelo aprisionamento de íons ou não aprisionamento (EKMAN et al., 2009; KILL, 2016; OGAWA, 2016).

Vale ressaltar que devido aos analisadores funcionarem de formas diferentes na separação dos íons, dessa forma todos os analisadores possuem suas vantagens e desvantagens, possuindo cada um sua especificidade no que diz respeito à resolução (capacidade de obter valores de m/z experimentais muito próximos aos teóricos) e exatidão (obtida através do erro em ppm) (HOFFMAN; STROOBANT, 2007; TOSATO, 2016).

Logo, quanto maior a capacidade do analisador em determinar a composição estrutural de compostos presentes na amostra analisada através dos valores de m/z obtidos para os íons formados, maior a resolução desse analisador (COOKS, 2006; KILL, 2016). Dentre os analisadores de massa, os mais utilizados são o quadrupolo, o TOF, o FTICR e o Orbitrap (Tabela 2) (ROMÃO, 2010; OGAWA, 2016; TOSATO, 2016).

Tabela 2. Exemplos de analisadores utilizados em MS

Características	Quadrupolo	TOF	FT-ICR	Orbitrap
Princípios de separação	Estabilidade de trajetória	Tempo de voo	Frequência de ressonância	Frequência de ressonância
Resolução	Baixa- média	Baixa- alta	A maior	Muito alta
Exatidão de massas	Baixa	Alta	Muito alta	Muito alta
Intervalo de m/z	Baixo	Muito alta	Médio	Baixo
Sensibilidade	Alta	Alta	Médio	Médio
Quantificação	Boa- muito boa	Média –boa	Médio	Médio
Fonte de íons	Continua	Pulsada/contínua	Pulsada/ contínua	Pulsada/ contínua
Velocidade	Médio-rápido	Rápida	Devagar-médio	Devagar-médio

Fonte: adaptado de EKMAN et al., 2009.

O FT-ICR utiliza da diferença das frequências ciclotron obtida por cada íon frente a um campo magnético para que seja realizada a separação dos mesmos (HOFFMAN e STROOBANT, 2007; OGAWA, 2016).

A espectrometria de massas possui uma altíssima resolução, principalmente no caso do FT-ICR MS que pode alcançar uma resolução de 10^7 . Resolução essa que possibilita a identificação e atribuição da composição de diversos compostos, inclusive amostras isobáricas que apresentem diferenças de massa de até 3,4 mDa (VAZ, 2010; OGAWA, 2016).

1.4.3 Espectrometria de massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR MS)

No que diz respeito ao FT-ICR MS vale ressaltar que o mesmo foi elaborado através da união de técnicas de forma que primeiramente Lawrence e colaboradores criaram no ano de 1930, a ressonância ciclotrônica de íons (ICR). Vinte anos depois, Sommer e colaboradores uniram a técnica baseada no ICR à espectrometria de massas. Por fim, as técnicas de ICR e MS foram unidas a transformada de Fourier por Comisarow e Marshall no ano de 1974 (KRAJ et al., 2008). Dessa forma, a ampla faixa de aplicação do FT-IRC MS é uma consequência da união das técnicas de forma a gerar um analisador de massas mais complexo (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; TOSATO, 2016).

Nesse analisador, os íons movimentam-se de forma circular devido ao campo magnético aplicado (B) e possuem sua própria frequência (associada ao m/z e que não é influenciado pela velocidade). Dessa forma o íon irá se movimentar em sentido perpendicular ao campo e os íons de cargas opostas apresentarão orbitas opostas (MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, 2002; KRAJ et al., 2008; TOSATO, 2016).

A cela de ICR possui como função o armazenamento de íons de forma que é possível obter a razão massa carga dos mesmos por meio da frequência ciclotrônica, pois a mesma é inversamente proporcional a m/z e é gerada devido à presença do campo magnético aplicado. A cela de ICR baseia-se em seis pratos que formam uma cela em que dois pratos são os de aprisionamento, dois de excitação e dois de detecção (TOSATO, 2016).

Para a obtenção do sinal pelo detector os íons a serem analisados devem estar realizando movimento sincronizado, dessa forma, para que os mesmos estabeleçam esse movimento um campo elétrico RF é aplicado na mesma frequência ciclotrônica de forma uniforme. Após isso, o sinal obtido é transformado para o domínio de tempo por transformada de Fourier e com a obtenção do espectro em frequência o mesmo é alterado para domínio de massas (Figura 16) (MARSHALL et al., 2007; TOSATO, 2016).

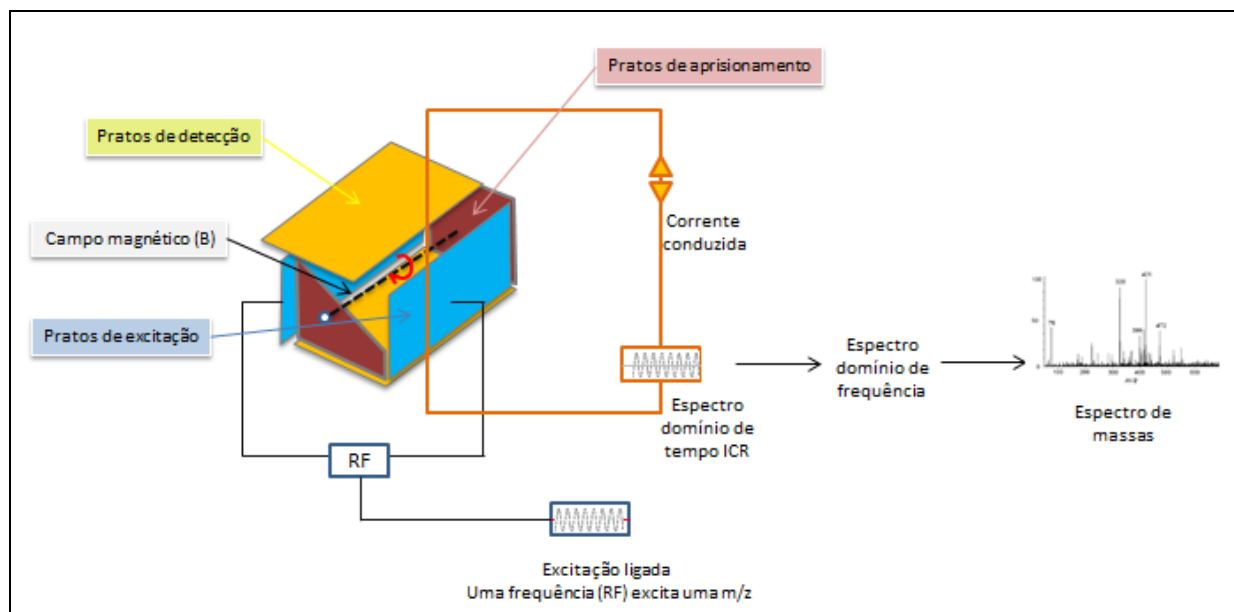


Figura 16. Esquema de funcionamento de cela de ICR.

Por fim, vale ressaltar que o FT-ICR MS possui uma resolução de massas muito alta e uma ampla faixa de detecção além da precisão de massa que possibilita uma separação e detecção de milhares de íons (KRAJ et al., 2008 MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, 2002; KILL, 2016).

2. OBJETIVOS

Considerando que frações provenientes de extrato acetato de etila de folhas de *Eugenia uniflora* e enriquecidas em flavonoides e taninos foram consideradas antivirais em ensaios preliminares sobre o MAYV realizados na UFRJ, objetivou-se:

- Identificar por ESI(-) FT-ICR MS, baseando-se em esquemas de fragmentação MS², flavonóides e taninos presentes em extrato acetato de etila de folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora*);
- Detectar e identificar, por meio da fonte de ionização ambiente paper spray ionization, flavonóides e taninos presentes em extrato acetato de etila de folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora*) e comparar os resultados obtidos com a técnica de ESI;
- Analisar a viabilidade de uma nova fonte de ionização ambiente, Leaf spray ionization, na detecção dos metabólitos diretamente da superfície das folhas de pitangueira, sem a necessidade de etapas de pré-extração ou separação. Comparar os resultados obtidos com a técnica de ESI;
- Comparar dois métodos extrativos diferentes utilizados na obtenção do perfil químico de *Eugenia uniflora* e na identificação de miricitrina;
- Correlacionar os compostos identificados com a atividade antiviral realizada no Instituto de Microbiologia Paulo de Goés - UFRJ.

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta e identificação da planta

Folhas de *Eugenia uniflora* foram coletadas na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), identificada pela professora Dra. Valquíria Ferreira Dutra (Departamento de Ciências Biológicas, UFES) e depositadas no Herbário Central VIES (UFES) sob o número VIES39620.

3.2 Preparo dos extratos para os testes antivirais

Folhas secas a temperatura ambiente (100 g) foram trituradas em metanol com o auxílio de um liquidificador e a mistura obtida foi transferida para um Erlenmeyer e deixada em repouso por 15 dias.

Após seco (12.5 g), o extrato metanólico foi suspenso em água para posterior partição com hexano (3 x 100 mL), diclorometano (3 x 100 mL) e acetato de etila (3 x 100 mL), respectivamente. Por esse procedimento foram obtidos as frações hexano (1.9 g), diclorometano (2.4 g) e acetato de etila (5.5 g).

3.3 Preparo das amostras para as análises de espectrometria de massas

Folhas de *Eugenia uniflora* (150g) foram coletadas às 8:00 da manhã na Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, em maio de 2017. A maior parte do material foi lavado e, posteriormente, seco em temperatura ambiente (25°C) durante 12 dias. Algumas folhas frescas foram limpas com um algodão embebido em metanol. Uma das folhas limpas foi analisada por (-)-LS-FT-ICR-MS.

Quatro outras folhas foram analisadas da seguinte forma: quatro béqueres foram postos lado a lado com hexano, diclorometano, acetona e metanol respectivamente. Dessa forma, uma das folhas frescas limpas foi submergida em hexano por dois minutos. A segunda foi submergida em hexano (2min) e em diclorometano (2min) respectivamente. A Terceira foi submersa da mesma forma que a anterior, mas posteriormente foi submersa em acetona (2min) e a quarta passou pelos mesmos processos da terceira, porém também foi submersa em metanol

(2min). Logo após os procedimentos, todas as folhas foram analisadas por LS(-)-FT-ICR-MS.

As folhas secas (20g), foram maceradas em metanol (500mL) durante 12 dias. O extrato metanólico obtido foi filtrado, concentrado em rotaevaporador e submetido à extração líquido/líquido para a obtenção das frações diclorometano (LLEdicl, 1,44 g), acetato de etila (LLEacet, 0,98 g) e água (LLEwat, 0,93 g). Todas as frações foram analisadas por (-)-PS-FT-ICR-MS e (-)-ESI-FT-ICR-MS.

Além disso, foi triturado 1g de folhas secas juntamente com 1,5g de sílica gel até a obtenção de uma solução sólida homogênea. Esse produto obtido foi empacotado em uma coluna de vidro para sua posterior eluição em diclorometano (200mL), acetato de etila (200mL) e metanol (200mL). As amostras (SEdicl SEacet e SEMet) foram analisadas por (-)-PS-FT-ICR-MS e (-)-ESI-FT-ICR-MS.

3.4 Análises das amostras por (-)-PS-FT-ICR-MS, (-)-LS-FT-ICR-MS e (-)-ESI-FT-ICR-MS

Para as análises do perfil químico das frações LLE e SE por (-) - ESI-FT-ICR-MS um espectrômetro FT-ICR MS (modelo 9.4 T Solarix, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha) foi utilizado e os espectros foram obtidos no modo negativo em uma faixa de massa m/z 150-1300. Entre as condições da fonte ESI utilizadas nas análises, estão a pressão do gás nebulizador de 1,4 Bar, a tensão capilar de 3,8 kV e a temperatura de transferência capilar de 200 ° C. Além disso, o tempo de acumulação dos íons foi de 0,010 s e cada espectro foi adquirido pela acumulação de 32 scans.

Os espectros foram obtidos com alta resolução (16 M) e erros de massa aproximados de 1 ppm, fornecendo fórmulas moleculares inequívocas para íons moleculares de carga única.

Para a análise das frações LLE e SE por (-)-PS-FT-ICR-MS, as amostras foram gotejadas em papel triangular equilátero com lados de 1 cm. As análises foram realizadas no modo negativo em uma faixa de massa m/z 150-1300. Entre as condições da fonte utilizada nas análises, estão tensão capilar de 3.8 kV e temperatura de transferência capilar de 200 ° C. O tempo de acumulação dos íons foi de 0.030s e TOF de 0.800. Cada espectro foi adquirido pela acumulação de 32

varreduras, com alta resolução (65000).

Para a análise de (-)-LS-FT-ICR-MS, as folhas frescas de *E.uniflora* foram cortadas na forma de triângulo equilátero com lados de 1 cm e foi utilizado o espectrômetro FT-ICR MS (modelo 9.4 T Solarix, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas no modo negativo em uma faixa de massa m/z 150-1300 em que as condições da fonte foram uma tensão capilar de 3.8 kV e uma temperatura de transferência capilar de 200 ° C. O tempo de acumulação dos íons foi de 0.030s e TOF de 0.800. Cada espectro foi adquirido pela acumulação de 32 varreduras, com alta resolução (65000).

3.5 Experimentos de (-)-ESI-FT-ICR-MS/MS

Para os experimentos de (-)-ESI-FT-ICR-MS/MS, a corrente contínua e o potencial de radiofrequência aplicado às varetas quadrupolo foram primeiro ajustados para permitir a passagem de apenas íons com m/z selecionado ± 1 , ou seja, a Janela do Quadrupolo em uma faixa de 1 Da. Logo depois disso, o íon foi conduzido ao hexapolo, contendo uma energia de colisão variável de 3 a 20V. Ar foi o gás de colisão utilizado. Além disso, o tempo de acumulação de íons no hexapolo foi ajustado para 1 para aumentar a quantidade de íons na célula ICR. Finalmente, os espectros foram obtidos a partir da acumulação de 32 scans com um domínio do tempo de 4M.

3.6 Análises fitoquímicas

O extrato acetato de etila (2,4 g) foi submetido a uma cromatografia em coluna utilizando Diaion HP-20. Um gradiente de metanol em água (0% MeOH → 100% MeOH) foi utilizado como fase móvel. Onze frações foram obtidas (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% MeOH) e as mesmas foram analisadas por placas de sílica gel TLC com EtOAc:MeOH:H₂O:CH₃COOH (8:1:05:05) como eluente. As placas foram borrifadas com NP-PEG para a detecção de flavonoides. Uma das frações (30%), com o spot amarelo mais pronunciado, foi escolhida para o teste de sua atividade antiviral juntamente com o extrato que originou o mesmo. Acetato de etila e sua fração foram analisados por cromatografia líquida acoplada ao detector de massas LC-QTOF-MS e por espectrometria de massas por (-)-ESI FTICR-MS.

3.7. Células e vírus

As células Vero (rim de macaco verde africano, ATCC CCL-81) foram cultivadas a 37°C com 5% de CO₂, no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Life Technologies, EUA) suplementado com 5% de soro bovino fetal (Cultilab, BRA) , 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). Os vírus Mayaro (ATCC VR-66, linhagem TR 4675) foram propagados em células Vero e os estoques virais em 10% de glicerol foram mantidos a -70°C. O título de vírus foi determinado por ensaio de placa (descrito em "Ensaio de atividade antiviral").

3.8. Ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral

A análise de citotoxicidade do extrato *Eugenia uniflora* EtOAc e as frações EtOAc_{f0-20%}, EtOAc_{f30-40%}, e EtOAc_{f50-80%} foram realizadas utilizando um método de absorção de corante modificado de Borenfreund e Puerner (BORENFREUND; PUERNER, 1985). Resumidamente, as culturas confluentes de células Vero em microplacas de 96 poços foram tratadas com meios de cultura contendo diferentes concentrações das substâncias testadas. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por uma solução de 50 µg/mL de vermelho neutro e as células foram incubadas durante 3 horas, a 37°C, 5% de CO₂. As células foram então fixadas com 20% de formaldeído e extraídas com 50% de metanol e 1% de ácido acético, antes da medição da absorbância a 490 nm, utilizando um espectrofotômetro para detectar incorporação de vermelho neutro por células vivas.

Os resultados da absorbância foram utilizados para calcular, por análise de regressão, as concentrações das substâncias testadas capazes de reduzir a viabilidade celular em 50% e 90% em relação aos controles (CC₅₀ e CC₉₀, respectivamente). A atividade antiviral foi avaliada utilizando um ensaio de inibição de rendimento de vírus. Resumidamente, as monocamadas de células confluentes crescidas em placas de 24 poços foram infectadas com MAYV (multiplicidade de infecção = 0,1) durante 1 hora, depois lavadas com PBS e tratadas durante 24 horas (a 37°C e 5% de CO₂) com diferentes concentrações (0 -100 µg/ml) de flavonóides ou extratos diluídos em meio de cultura. Após o tratamento, os sobrenadantes de cultura foram recuperados e utilizados para titulação de partículas de vírus

infecciosas extracelulares.

Para titulação de vírus, monocamadas de células confluentes em placas de 24 poços foram infectadas com diluições em série de sobrenadantes recuperados durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Após a remoção do inoculo, as células foram enxaguadas com PBS e a monocamada foi incubada com meio fresco com 2% de carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich, EUA) durante 48 horas a 37°C, 5% de CO₂. Finalmente, as células foram fixadas com 20% de formaldeído e coradas com 0,5% de violeta de cristal em etanol a 20%, e as placas virais foram contadas. Ribavirina (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada como controle positivo para a inibição da replicação MAYV. Para cada substância ou extrato, os valores IC₅₀ e IC₉₀ foram calculados e utilizados para obter um índice de seletividade (SI), expresso como razão CC₅₀/IC₅₀, e estimar a potência relativa (RP) como a relação entre ribavirina (substância de referência) IC₉₀ e IC₉₀ da substância testada.

Os resultados foram apresentados como concentração inibitória / citotóxica média ± DP, e os testes t foram utilizados para avaliar a significância estatística dos tratamentos em relação aos controles. Os valores de P < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade antiviral

O extrato EtOAc de *Eugenia uniflora* e sua fração EtOAc_{f30%} foram submetidos a análise de citotoxicidade e atividade antiviral. A Tabela 3 mostra valores interessantes de seletividade e potência relativa, onde todas as amostras testadas apresentaram maior seletividade e potência quando comparadas à ribavirina, substância aprovada clinicamente no tratamento da Hepatite C e que experimentalmente demonstrou inibir diversos outros vírus tais como Hepatite B, Influenza e Poliomielite (ELIA et al., 2008).

Tabela 3. Atividade antiviral das frações do extrato de *Eugenia uniflora*

Substância	CC ₅₀ (µg/mL) ^a	CC ₉₀ (µg/mL) ^b	IC ₅₀ (µg/mL) ^c	IC ₉₀ (µg/mL) ^d	SI ^e	RP ^f
EtOAc (23)	354,7 ± 25,9	88 ± 2,8	0,81 ± 0,23	2,6 ± 0,76	437	54
EtOAc _{f0-20%} (22)	86,2 ± 3,8	32,5 ± 1,2	0,24 ± 0,03	0,52 ± 0,07	359	44
EtOAc _{f30-40%} (21)	875,1 ± 86,2	34,3 ± 4,1	0,33±0,05	10,4±1,55	2651,8	331,5
EtOAc _{f50-80%} (20)	520,8 ± 51,5	104,2 ± 10,3	2,95±0,62	10,65±2,26	176,5	22
ribavirin ^f	523,1 ± 42,5	215,4 ± 6,2	62,3 ± 4,4	112,4 ± 8,2	8	Nd

^aCC₅₀ - concentração onde se tem 50% de células viáveis.; ^bCC₉₀ - concentração onde se tem 90% de células viáveis; ^cIC₅₀ – concentração onde se tem 50% de inibição da replicação viral; ^dIC₉₀ – concentração onde se tem 90% de inibição da replicação viral; ^eSI – Índice de seletividade da substância = CC₅₀/IC₅₀; ^fRP – Potência relativa a ribavirina SIs_{subs}/SI ribavirina

A fração EtOAc_{f30-40%} foi aquela com maiores índices de seletividade e potência relativa (2651,8 e 331,5), seguida por EtOAc (437 e 54), EtOAc_{f0-20%} (359 e 44) e, finalmente, por EtOAc_{f50-80%} (176,5 e 22) (Figura 17). Corroborando com os valores de seletividade e potência obtidos, os valores de concentração dos extratos para a inibição da replicação viral (IC₅₀ e IC₉₀) apontam para o alto potencial antiviral das amostras, uma vez que apresentaram valores muito inferiores aos da ribavirina (Figura 18).

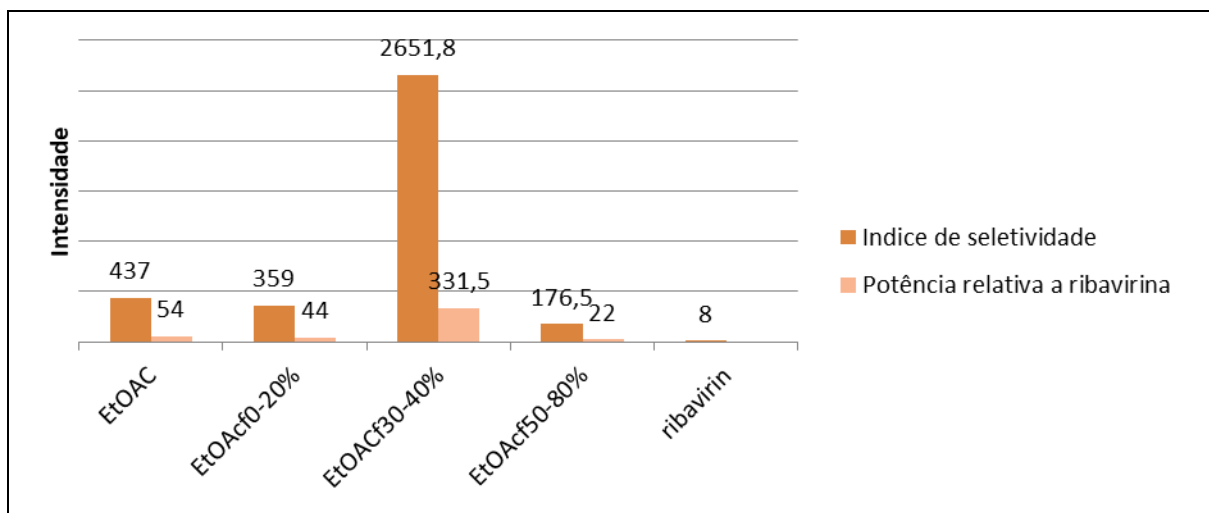


Figura 17. Índice de seletividade e potência relativa à ribavirina das amostras testadas

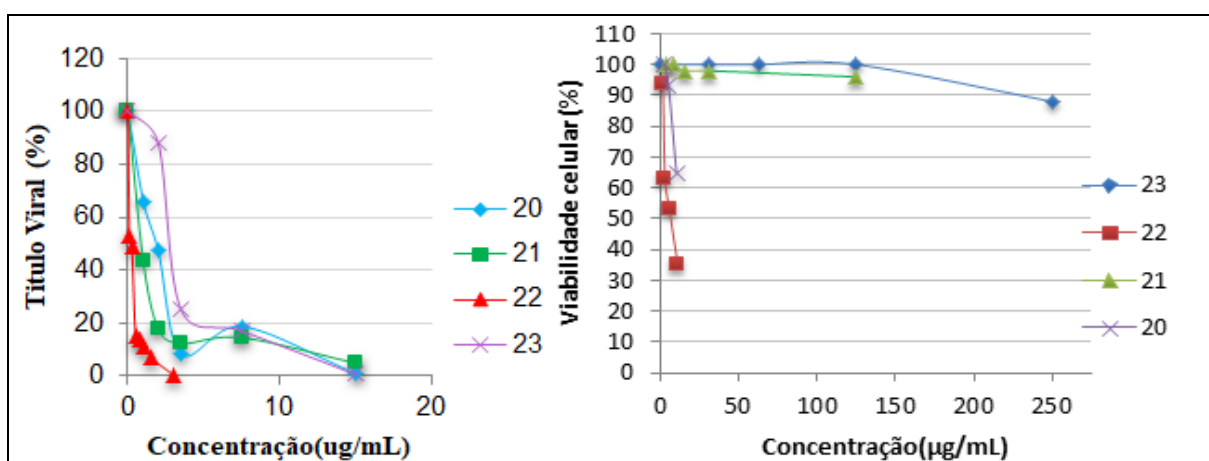


Figura 18. Efeito do extrato de *Eugenia uniflora* na replicação do vírus Mayaro e viabilidade celular – extrato de *Eugenia uniflora*

*20= EtOAcf50-80%, 21= EtOAcf30-40%, 22= EtOAcf0-20%, 23= EtOAc.

É conhecido que as folhas de *E. uniflora*, além de uma gama de compostos já descritos, possuem em sua composição taninos como eugeniflorina D1, eugeniflorina D2, oenoteína B e flavonóides como kaempferol, miricetina, quercetina, galocatequina e miricitrina (CARVALHO, 2013). Reforçando tais afirmações, as frações EtOAc_{f0-20%} e EtOAc_{f30-40%}, as quais foram submetidas a análises de citotoxicidade e atividade antiviral, apresentaram em suas composições uma diversidade de taninos e flavonoides. Logo, o alto potencial antiviral obtido para tais amostras pode ser atribuído à presença desses compostos nos extratos, uma vez que os mesmos são conhecidos por possuírem diversas atividades biológicas já relatadas, entre elas, atividade antiviral (FUKUCHI et al., 1989; NAKASHIMA et al., 1992; KHACHATOORIAN et al., 2012; DAYEM et al., 2015; LIU et al., 2016; QIU et al., 2016).

Ainda que seja desconhecido o mecanismo de atuação dos extratos testados frente ao vírus Mayaro, diversos estudos atribuem à classe dos flavonoides, diferentes mecanismos antivirais. Como por exemplo, a capacidade de inibição da replicação e da infecciosidade do vírus alvo estudado, além da atividade antiviral frente ao Herpes simplex vírus (HSV) tipo 1 e 2 e atividade anti-HIV da classe dos flavonoides (AHMAD et al., 2015). Também vale ressaltar que os taninos hidrolisáveis do extrato de folha de *E. uniflora* possuem capacidade de inibir a DNA polimerase do vírus Epstein-Barr, vírus esse, que se apresenta intimamente associado a casos de carcinoma nasofaríngeo (LEE et al., 2000).

No que diz respeito à atividade anti-Mayaro de flavonoides e taninos, podem ser citados alguns exemplos, entre estes o estudo realizado por Spindola e colaboradores que atribuiu aos taninos e flavonoides presentes em extrato de *Cassia australis* a atividade antiviral frente ao vírus Mayaro (SPINDOLA et al., 2014).

Segundo Dos Santos e colaboradores (2014), os flavonóides do grupo quercetina apresentam atividade antiviral frente ao vírus Mayaro (MAYV), sugerindo assim, que o vírus possui na constituição de seu envelope proteínas que interagem com esse grupo de compostos. Já os taninos e demais polifenóis, podem interagir tanto com o envelope que constitui o vírus como também com partículas proteicas presentes na superfície da célula hospedeira (DOS SANTOS et al., 2014).

Também é sugerida a atividade de taninos condensados frente ao vírus influenza A por Yang e colaboradores em estudo realizado com polifenóis derivados de *Camellia sinensis* (YANG et al., 2014). Além disso, os mesmos, ao serem testados anteriormente, apresentaram atividade antiviral frente ao vírus influenza A (FLU-A), vírus parainfluenza (PIV) e Vírus Sincicial Respiratório (RSV), inibindo também o crescimento do vírus Herpes simplex 1 e 2 (HSV-1, HSV- 2) (AHMAD et al., 2015) e vírus da Hepatite A e B (VHA e VHB) (DE BRUYNE et al., 1999). Dessa forma, é sugerido que os taninos condensados, testados nesse caso, se ligariam ao envelope do vírus, de forma a inibir a penetração do vírus na membrana da célula.

Portanto, o alto potencial antiviral observado para as frações EtOAc_{f0-20%} e EtOAc_{f30- 40%} pode ser atribuído aos taninos presentes na fração EtOAc_{f0-20%} e flavonoides da fração EtOAc_{f30-40%}, visto que, em estudos envolvendo a atividade

anti-Mayaro de taninos e flavonoides em extrato de *Cassia australis* e flavonóides do grupo quercetina revelaram a atividade de tais compostos (SPINDOLA et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2014).

Porém, apesar do alto potencial antiviral obtido para todos os extratos e frações testadas, os mesmos apresentaram valores mais baixos de CC₅₀ e CC₉₀ do que ribavirina, indicando que, embora sejam mais seletivos e potentes, são mais citotóxicos que a mesma (Figura 17, 18). Nota-se que, entre as frações que apresentaram maior potencial antiviral, a fração EtOAc_{f0-20%}, quando comparada com a fração EtOAc_{f30-40%}, apresentou maior citotoxicidade. Esse fato pode ser atribuído a maior quantidade de taninos na fração EtOAc_{f0-20%}.

Finalmente, entre os extratos testados, EtOAc_{f30-40%} foi o que apresentou a maior potência e seletividade entre todas as frações testadas, enquanto EtOAc_{f50-80%} foi o que apresentou menor potência e seletividade entre todas as frações testadas, entretanto, apresentou uma citotoxicidade aproximada do valor obtido para a ribavirina.

4.2. Perfil químico e identificação de compostos fenólicos em fração ativa frente ao vírus Mayaro (LLEacet) por ESI(-) e ESI(-)MS/MS

Assim como descrito anteriormente, a classe dos flavonoides é conhecida como uma classe que possui diversas atividades biológicas tais como: antioxidante e antiinflamatória (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008), anticancerígena (RAFFA et al., 2017), antibacteriana (CUSHINE; LAMB, 2005; AMIN et al., 2015b) e antiviral, como no caso da quercetina e seus derivados (DOS SANTOS et al., 2014).

Logo, tais compostos podem ser os responsáveis por fornecer atividade antiviral às frações testadas, visto que, flavonoides quercetina e seus derivados (quercetin 3-O-glycosides), encontrados em folhas de *Bauhinia longifolia* possuem atividade anti-MAYV (DOS SANTOS et al., 2014).

Considerando que as frações de acetato de etila apresentaram elevado potencial antiviral frente ao MAYV e valores de seletividade e potência relativas maiores que os da Ribavirina em ensaio biológico, LLEacet foi submetida a análise

Tabela 4. Compostos fenólicos identificados em LLEacet de folhas de *Eugenia uniflora* por ESI(-)FT-ICR MS

<i>m/z</i> Mensurado	Formula Molecular [M – H] ⁻ or [M+Cl] ⁻	Erro (ppm)	DBE ^a	MS/MS	Compostos	Referências
169.01415	C ₇ H ₅ O ₅	0.58	5	125	Gallic Acid	DA CUNHA et al., 2016; PENG et al., 2016
183.02998	C ₈ H ₇ O ₅	-0.47	5	168, 140	O-Methyl-Gallic acid	PENG et al., 2016
191.05622	C ₇ H ₁₁ O ₆	-0.57	2	-	Quinic acid	
339.03586	C ₁₄ H ₁₂ O ₁₀	-0.27	9	169	Gallic Acid Cluster	
353.05150	C ₁₅ H ₁₄ O ₁₀	-0.23	9	169, 183	Gallic acid + O-Methyl-gallic acid cluster	
353.08791	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	-0.28	8	-	Chlorogenic acid	
447.09342	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	-0.31	12	301	Quercitrin	DA CUNHA et al., 2016; RATTMAN et al., 2012
449.07268	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	-0.30	12	316	Myricetin pentoside	RATTMAN et al., 2012
463.08831	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-0.24	12	316	Myricitrin	DA COSTA et al., 2016; FORTES et al., 2015
483.07016	C ₂₁ H ₂₀ ClO ₁₁	-0.40	12	447	Quercetin rhamnoside chloride cluster	
483.07823	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	-0.42	11	-	digalloylglucose	
483.04938	C ₂₄ H ₁₆ O ₉ Cl	-1.14	17	-	-	
483.02076	C ₂₂ H ₁₂ O ₁₃	-0.51	17	-	-	
499.06499	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ Cl	-0.11	12	463	Myricitrin chloride cluster	DA COSTA et al., 2016
526.08405	C ₂₁ H ₂₀ NO ₁₅	-0.39	12	463	Myricitrin nitrate cluster	
577.08122	C ₂₅ H ₂₁ O ₁₆	3.89	15		ellagitannin	
615.0994	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	-0.39	17	463, 316	myricetin-3-O-(2"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside	FORTES et al., 2015
633.1099	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₇	-0.28	16	463, 316	myricetin-3-O-(2"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside hydrate	
633.07350	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈	-0.26	17		Gemin/ Hippomanin	FORTES et al., 2015

^aDBE: ring/bond double equivalente

Outros compostos também derivados da miricitrina puderam ser encontrados no espectro de massas obtido, estando entre estes o íon 615,0994 da myricetin-3-O(2"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside [C₂₈H₂₄O₁₆-H]⁻ e o íon 633,1099 da myricetin-3-O(2"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside hydrate [C₂₈H₂₆O₁₇-H]⁻ já conhecidos em *E. uniflora* (FORTES et al., 2015). Os glicosídeos de quercetina (*m/z* 447,09342 [C₂₁H₁₉O₁₂-H]⁻ e seu aduto 483,04938 [C₂₁H₂₀ClO₁₁]⁻) foram compostos que apresentaram sinais menos intensos nesse extrato.

Os sinais não identificados que puderam ser relatados em outros estudos (RATTMANN et al., 2012) e que estão relacionados a prováveis flavonóides ou taninos glicosilados, como m/z 653 e 539 puderam ser obtidos no espectro. No entanto, os flavonóides que já foram identificados em extratos de folhas de *Eugenia uniflora* como kaempferol, rutina, desmantina-1 e galocatechin (FORTES et al., 2015; DA CUNHA et al., 2016) não apresentaram sinais correspondentes no extrato de acetato de etila analisado por (-) - ESI-FT-ICR MS.

Experimentos MS/MS também foram realizados para os sinais de maior interesse e que apresentaram maior intensidade (Figura 20) com o objetivo de confirmar as fórmulas moleculares sugeridas e, no caso dos flavonoides, por meio da identificação das suas agliconas.

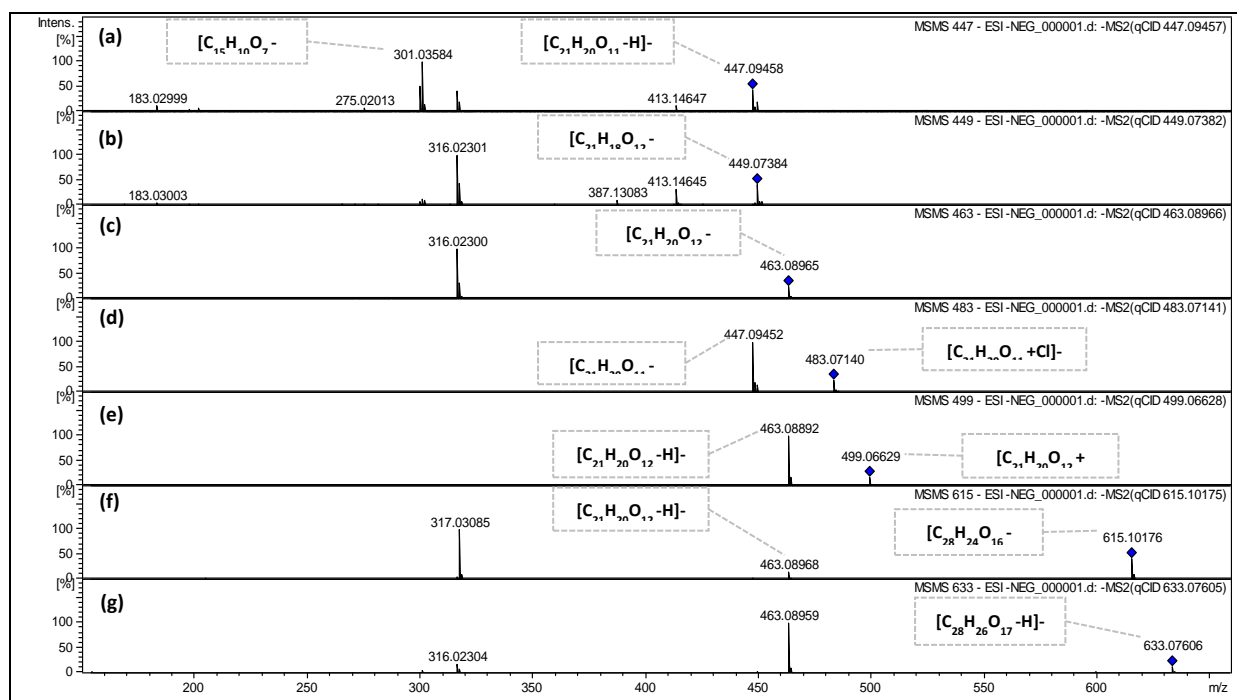


Figura 20. ESI(-)MS/MS para os íons m/z (a) 447, (b) 449, (c) 463, (d) 483, (e) 499, (f) 615, and (g) 633.

A partir da fragmentação dos íons 447, 449 e 463, foram obtidos os fragmentos de massa em m/z 301 e 316 referentes à quercetina e a miricetina respectivamente (Figura 21). Dessa maneira pode-se afirmar que ambas são as agliconas referentes aos íons analisados (CUYKENS e CLAEYS, 2005).

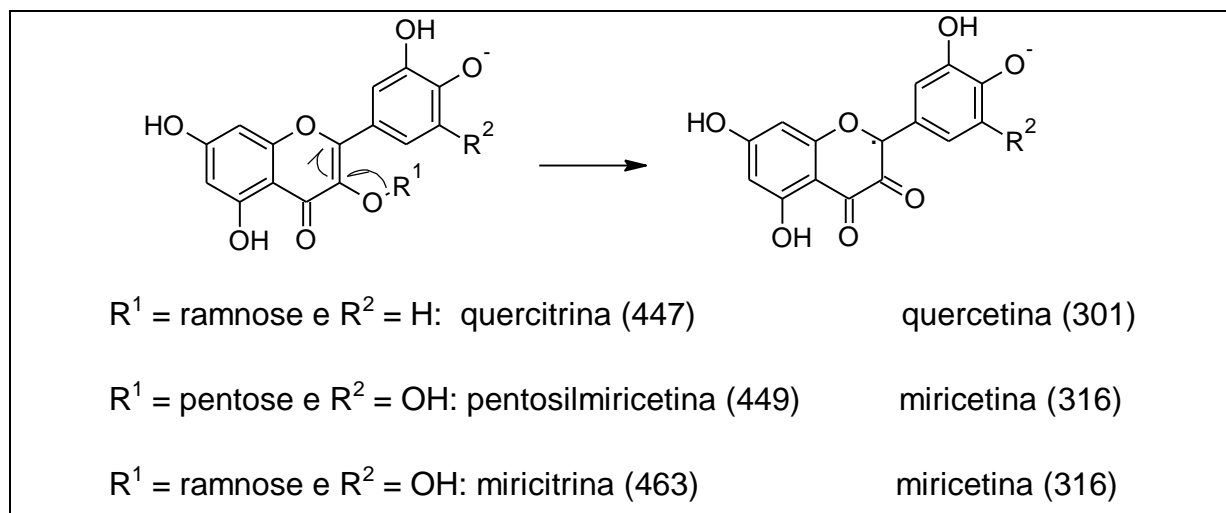


Figura 21. Proposta de fragmentação para flavonoides glicosilados presentes em folhas de *Eugenia uniflora*.

A dissociação induzida por colisão (CID) dos *clusters* levou ao fragmento m/z 463 $[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}-\text{H}]^-$, que, por sua vez, deu origem à aglicona miricetina após a perda de ramnose. Assim, foi possível afirmar que os íons m/z 499 e 526 são aglomerados de miricitrina, pois a mesma foi gerada no CID do aduto (Fig. 20-e). Este flavonóide pode ser encontrado como parte de estruturas mais complexas, tais como $[\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_{16}-\text{H}]^-$ e $[\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{O}_{17}-\text{H}]^-$ referentes aos íons 615 e 633 respectivamente (Fig. 20-fg), onde suas CID revelaram a existência de fragmentos m/z 463 (miricitrina) e 316 (miricetina). Já no caso dos íons derivados de quercetina, a fragmentação do íon $[\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}-\text{H}]^-$ de m/z 447 (Fig. 20a) produziu um fragmento em m/z 301 após a perda neutra de ramnose, enquanto a CID do íon de m/z 483 gerou quercitrina após perda de cloreto (Fig. 20-d). Apesar disso, é importante destacar que os glicosídeos de quercetina tais como a quercitrina (m/z 447 e $M = \text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$) e seu respectivo cluster (m/z 483, $[\text{M} + \text{Cl}]^-$) foram menos detectados na fração LLEacet (Figura. 20 e 22).

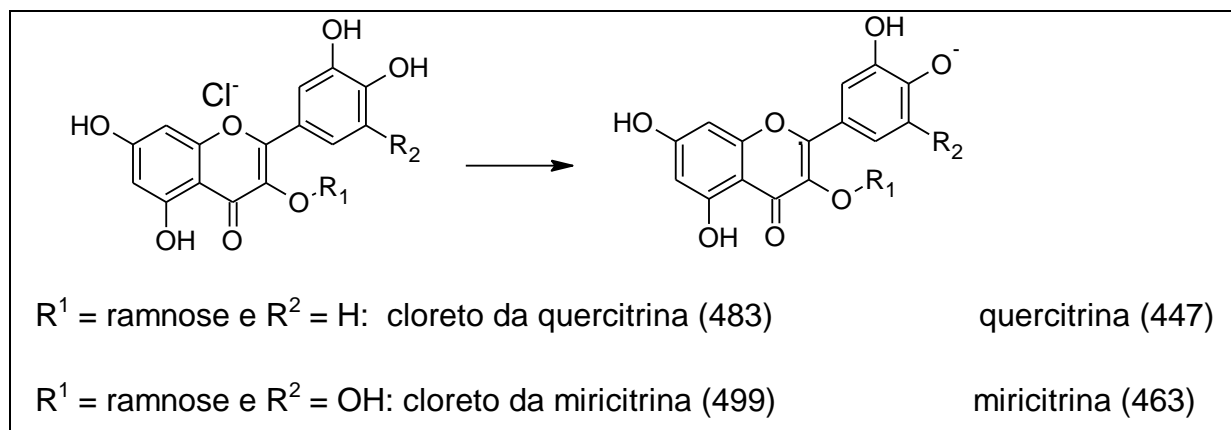


Figura 22. Dissociação Induzida por Colisão (CID) de agregados (clusters) de cloretos flavonoídicos

Ácido gálico (m/z 169,01415 - $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5$), ácido O-metilgálico (m/z 183,02998 - $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_5$) e seus clusters (m/z 339,03586 - $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_{10}$ e m/z 353 - $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_{10}$) podem ser vistos no espectro de massas (Tabela 4). Sua presença tem um significado importante, uma vez que a planta produz taninos gálicos e elágicos (LEE et al., 1997; LEE et al., 2000; MUELLER-HARVER, 2001) ainda que os taninos puderam ser identificados em sinais de intensidades muito baixas. Di-O-galloyl-*D*-glucose ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_{14}$, m/z 483,07823) e gemin D/hippomanin A ($\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{O}_{18}$, m/z 633,07350) são exemplos de taninos gálicos e elágicos respectivamente. A CID do ácido gálico originou o fragmento m/z 125 de forma a confirmar a descarboxilação desse composto. Enquanto os fragmentos gerados pela CID do íon m/z 183 foram m/z 168 e m/z 140 referentes à perda de uma metila seguida pela perda de uma carbonila (Figura 23).

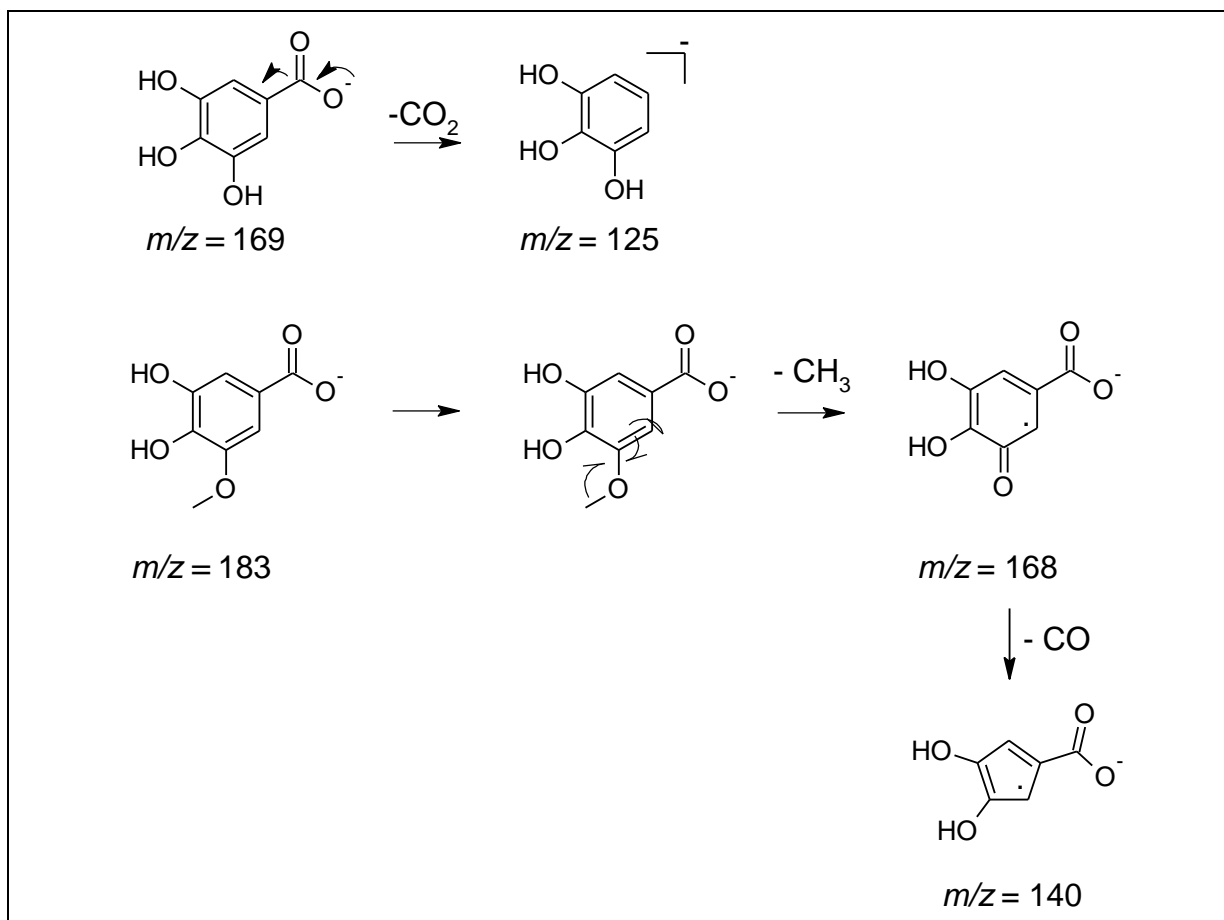


Figura 23. Proposta de fragmentação dos íons $[M-H]^-$ 169 e 183 do ácido gálico e O-metilgálico

Embora o ácido 3-O-metilgálico seja amplamente encontrado em plantas, não se descarta a presença do ácido 4-O-metilgálico para o íon 183, embora seja consideravelmente mais raro.

Assim, a partir do perfil químico da fração de acetato de etila do extrato de folhas de *Eugenia uniflora* é possível relacionar a atividade antiviral obtida para as frações de acetato de etila previamente analisadas à presença de flavonóides na mesma, uma vez que estes compostos são conhecidos por possuir diversas atividades biológicas entre elas a atividade antiviral. Além disso, observou-se também que os sinais mais intensos pertencem a miricitrina (m/z 463 - $[C_{21}H_{19}O_{12}-H]^-$) e seu cluster (m/z 499 - $[C_{21}H_{20}O_{12}+Cl]^-$).

Dessa forma, vale ressaltar que a miricitrina, composto que apresentou um dos sinais mais intensos, possui diversas atividades biológicas descritas, estando entre estas a atividade antimicrobiana (CUSHNIE; LAMB, 2005), antinoceptiva

(MEOTTI et al., 2006), anti-inflamatória (QI et al., 2017) e anti-carcinogênica (LEE; KANG; CHO, 2007; KALE; GAWANDE; KOTWAL, 2008).

Diversos compostos fitoquímicos foram analisados por Amin e colaboradores por meio de modelagem molecular-MOE (Meio Ambiente Operacional Molecular), de forma a verificar a compatibilidade dos compostos testados com a proteína NS5 do vírus da Dengue. A miricitrina apresentou bons resultados nos testes (AMIN et al., 2015a), de forma que, a mesma possui facilidade de interação com a proteína NS5, tornando-se um candidato à atividade antiviral.

Além disso, a miricitrina apresenta ação antinociceptiva (MEOTTI et al., 2006; MEOTTI et al., 2007; CÓRDOVA et al., 2011), justificando o uso popular da mesma no alívio dos sintomas da febre da dengue. Portanto, uma vez que MAYV pertence à família de *flavivírus*, é possível que a miricitrina seja um dos compostos que confere esta atividade anti-MAYV às frações de acetato de etila, tanto de forma isolada como de forma aditiva a outros flavonoides presentes em sua composição.

4.3. Distribuição de flavonóides, principalmente miricitrina e seus derivados, em extratos obtidos por LLE e SE.

Três métodos de extração foram investigados com a finalidade de analisar sua eficiência na identificação da miricitrina e na obtenção do perfil químico de folhas de *Eugenia uniflora* por espectrometria de massas. Um deles, o tradicional, foi baseado na extração com solventes de polaridade crescente ou partição líquido/líquido sucessiva. Neste método foram obtidas três partições, LLE_{dicl}, LLE_{acet} e LLE_{wat}. A figura 24 mostra a maior extração de flavonóides com acetato de etila, quando comparado aos outros dois solventes (Fig. 24a, b e c). Logo, os valores de intensidade relativa (IR) obtidos para o íon miricitrina [C₂₁H₂₀O₁₂-H]⁻ no espectro de ESI(-)MS foram de 8,33%, 92,54% e 1,99% para LLE_{dicl} (Fig.24a), LLE_{acet} (Fig.24b) e LLE_{wat} (Fig.24c) respectivamente e 3,39%, 100% e 5,77% para cloreto de miricitrina (cluster).

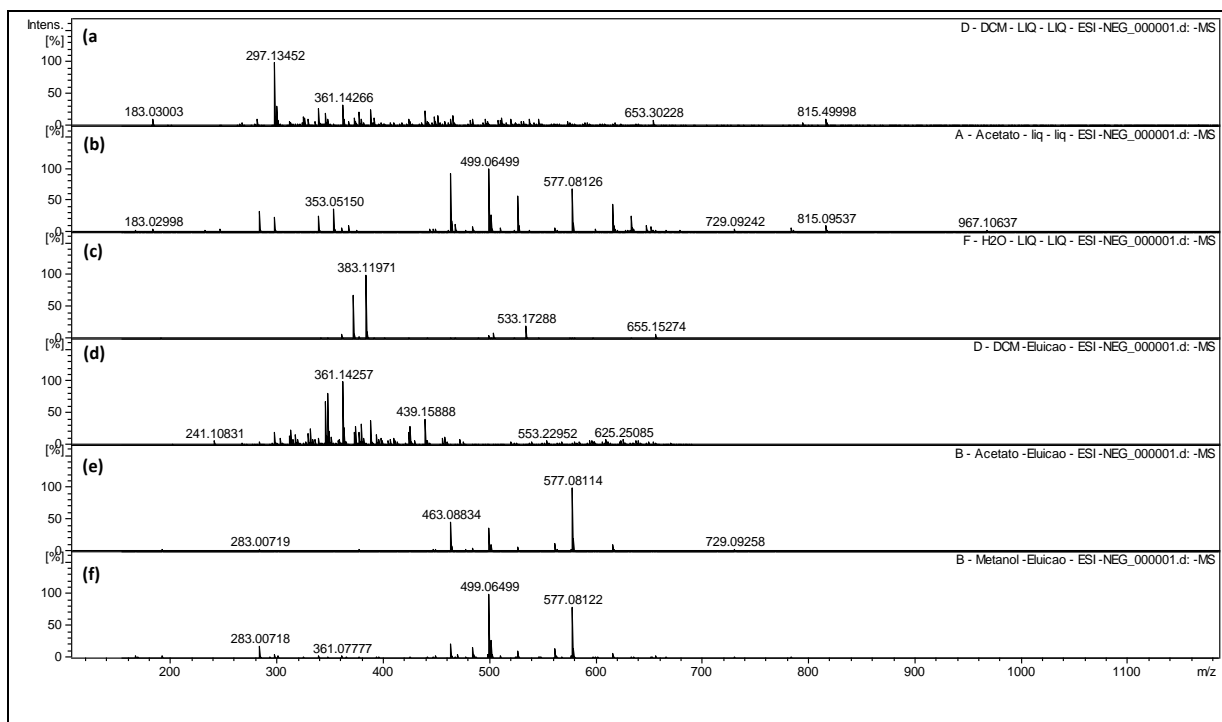


Figura 24. Espectros de massa ESI(-) de (a) diclorometano (LLE_{dicl}), (b) acetato (LLE_{acet}), (c) água (LLE_{wat}), (d) diclorometano (SE_{dicl}), (e) acetato (SE_{acet}) e (f) frações de metanol (SE_{met}).

O outro aduto ($[C_{21}H_{20}O_{12}+NO_3]^-$) apresentou valores de intensidade relativa de 0.72%, 57.19% e 0.19% (tabela 5), respectivamente. Resultados similares puderam ser observados para os ácidos fenólicos. Dessa forma é possível afirmar que o acetato de etila é um solvente eficiente para a extração de flavonoides e ácidos fenólicos por partição liquido-liquido.

Também foi investigada a extração com base na trituração das folhas com gel de sílica seguida de eluição com solventes (diclorometano, acetato de etila e metanol). O espectro de massas das amostras SE_{dicl} (Fig.24d), SE_{acet} (Fig.24e) and SE_{met} (Fig.24f) revelaram uma maior presença dos flavonoides m/z 463 and m/z 499 nos elutos de acetato de etila (SE_{acet}) e metanol (SE_{met}).

Visto que a sílica gel possui uma forte interação com compostos fenólicos, apenas o acetato de etila não possui capacidade de deslocá-los completamente da fase estacionária, de forma que o metanol é necessário para completar a extração de flavonóides. Dessa forma, para a extração dos flavonóides é mais eficiente a substituição do acetato de etila pelo metanol. No entanto, em ambas as técnicas de extração LLE e SE, a fração de acetato de etila foi a que extraiu uma maior variedade de flavonóides e apresentou uma intensidade considerável dos sinais de

interesse. Entre os dois métodos de extração utilizados (LLEacet e SEacet), o método que obteve a maior seletividade para miricitrina (m/z 463) e seu cluster (m/z 499) foi SEacet, enquanto o LLEacet revelou sinais mais intensos quando comparado ao SEacet (Figura 24).

Os ácidos fenólicos, compostos mais polares do que os flavonóides, não puderam ser efetivamente detectados nas amostras SE_{Si}, uma vez que foram eluídos com acetato de etila e metanol moderadamente (Fig. 24e e 24f). Dessa forma, enquanto a extração de LLEacet apresentou um valor de IR de 4,79% para ácido O-metil-gálico, esse valor foi de apenas 0,28% e 0,86% para as amostras SEacet e SE_{Met}, respectivamente.

4.4. Comparação das técnicas de ionização na obtenção do perfil químico e identificação de miricitrina.

Todas as frações acetato obtidas pelas extrações LLE e SE foram submetidas a análise por espectrometria de massas por duas fontes de ionização distintas, sendo a primeira a fonte de *eletrospray* e a segunda a fonte *paperspray*. Além disso, também foi realizada a análise direta de folhas de *Eugenia uniflora* e sua análise após lavagens sucessivas com diferentes solventes. Os valores de intensidade relativa referente a cada um dos compostos identificados anteriormente podem ser verificados na tabela 5.

Tabela 5. Compostos fenólicos identificados em folhas de *Eugenia uniflora* por ESI(-)MS, PS(-)MS e LS(-)MS

<i>m/z</i> medido	Compostos	Intensidade relativa (%)								
		LLE _{acet} ESI	LLE _a cet PS	SE _{ac} et ESI	SE _{ac} et PS	FA ₁ LS	FA ₂ LS	FA ₃ LS	FA ₄ LS	FA ₅ LS
169.01415	Gallic Acid	2.73	45.6 1	0	3.34	-	-	-	-	-
183.02998	O-Methyl-Gallic acid	4.79	100	0	24.4 1	-	-	-	-	-
191.05622	Quinic acid	-	1.44	-	-	81.7 7	49.2 8	15.2 3	31.5 3	42.1 5
339.03586	Gallic Acid Cluster	25.87	17.2 0	0	0	-	-	-	-	-
353.05150	Gallic acid + O-Methyl-gallic acid cluster	36.84	29.5 1	0	0	-	-	-	-	-
353.08791	Chlorogenic acid	3.29	2.73	0.95	2.06	2.81	2.17	-	-	-
447.09342	Quercitrin	5.91	1.92	3.19	21.9 9	-	-	-	-	2.14
449.07268	Myricetin pentoside	5.98	1.32	2.79	1.72	-	-	-	-	1.71
463.08831	Myricitrin	92.54	16.0 4	45.8 1	17.8 4	2.27	6.94	1.74	3.04	16.7 1
483.07016	Quercetin rhamnoside chloride cluster	9.28	3.93	5.12	64.4 2	-	-	-	1.62	9.15
483.07823	digalloylglucose	2.43	0	0	0	-	3.13	-	-	-
483.04938	-	1.22	0	0	0	-	-	-	-	-
483.02076	-	2.71	0	0	0	-	-	-	-	-
499.06499	Myricitrin chloride cluster	100	20.8 6	37.3 2	34.0 7	4.65	14.7 4	4.71	5.18	44.6 5
526.08405	Myricitrin nitrate cluster	57.19	10.1 0	7.35	15.3 0	-	-	-	-	1.87
577.08122	ellagitannin	67.98	0	100	1.17	-	-	-	-	-
615.0994	myricetin-3-O-(2"-O-galoyl)- α -L-ramnopiranoside	45.42	4.52	10.8 6	2.70	-	-	-	-	2.71
633.1099	myricetin-3-O-(2"-O-galoyl)- α -L-ramnopiranoside hydrate	26.41	1.90	1.52	0	-	-	-	-	-
633.07350	Gemin/Hippomanin	6.46	0	0.91	0	-	2.33	-	-	-

4.4.1. ESI-MS versus PS-MS

Todas as amostras contendo miricitrina LLEacet, SEacet e SEmet foram analisadas por espectrometria de massas pelas fontes de ionização, *eletrospray* (ESI) e *paperspray* (PS), ambos em modo negativo de forma a verificar qual a melhor fonte de ionização para a análise de miricitrina e obtenção do perfil químico (Tabela 5, Figura 25).

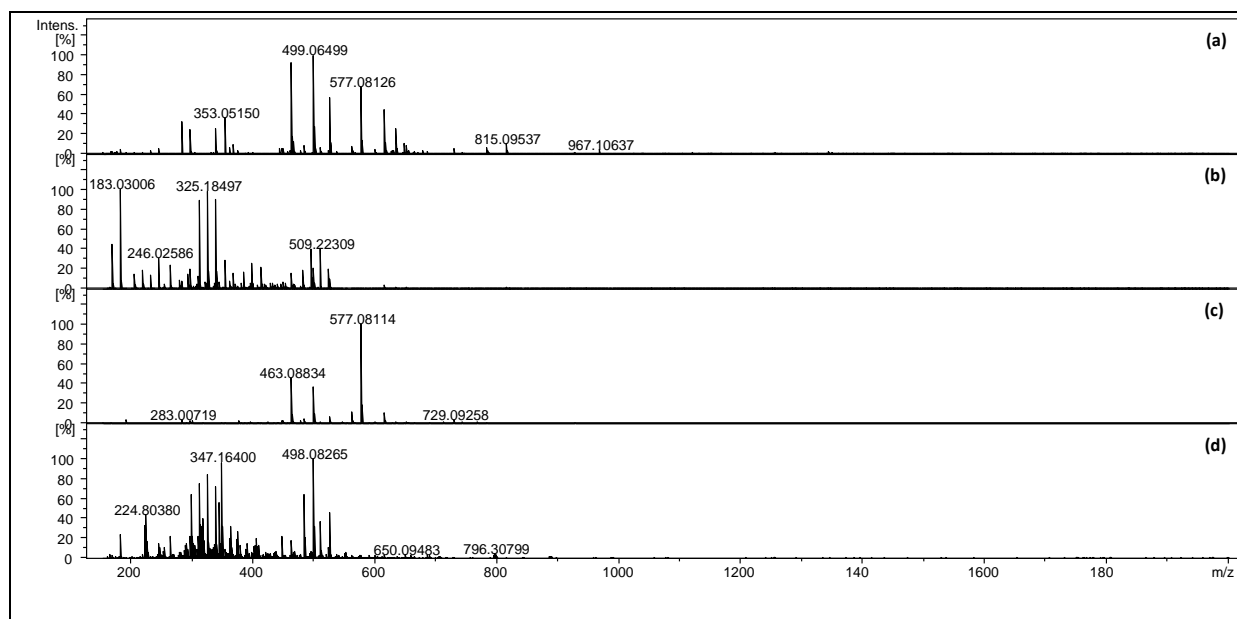


Figura 25. ESI(-)FT-ICR MS das frações (a)LLE_{acet}, e (c)SE_{acet}, e PS(-)FT-ICR MS das frações (b)LLE_{acet}, e (d)SE_{acet}

Conforme verificado na Figura 25, a fonte PS revelou não ser uma fonte de ionização eficiente para os flavonóides nesse caso, de forma que, a figura 6a revela que o método de ionização ESI apresentou sinais mais intensos no que diz respeito ao íon de m/z 463 referente à miricitrina enquanto o composto representado pelo íon de m/z 483 (C₂₁H₂₀ClO₁₁) foi o único flavonóide que apresentou maior intensidade de sinal quando analisado por PS(-)FT-ICR-MS. No entanto, o *paperspray* proporcionou uma maior eficiência na identificação de compostos como carboidratos (325.07817 - C₁₁H₁₇O₁₁) e ácidos fenólicos, tais como ácido gálico (169.01415 - C₇H₅O₅) e methyl gallate (183.02998 - C₈H₇O₅), pois apresentaram sinais mais intensos na faixa m/z 150-350 do que no *eletrospray*. Isso pode ser explicado devido ao fato desses compostos possuírem alta solubilidade em metanol, solvente esse utilizado para eluir os compostos do papel em direção ao espectrômetro de massas.

Os flavonoides de m/z 447, 449, 463 e 615, os clusters de m/z 339, 353, 499 e 526, além dos taninos de m/z 633 e 577, em LLE_{acet} foram melhor ionizados por ESI(-) como mostrado na figura 26. Entretanto, no que diz respeito à quercitrina (m/z 447) e seu cluster (m/z 483), quando extraído por SE_{acet} apresentaram maiores intensidades ao serem submetidas a PSI(-)MS do que por ESI(-)MS. Esse fato deve-se aos flavonoides derivados da quercetina apresentarem uma melhor eluição em sílica gel quando comparados aos flavonoides derivados de myricetin devido ao fato dos mesmos serem menos polares.

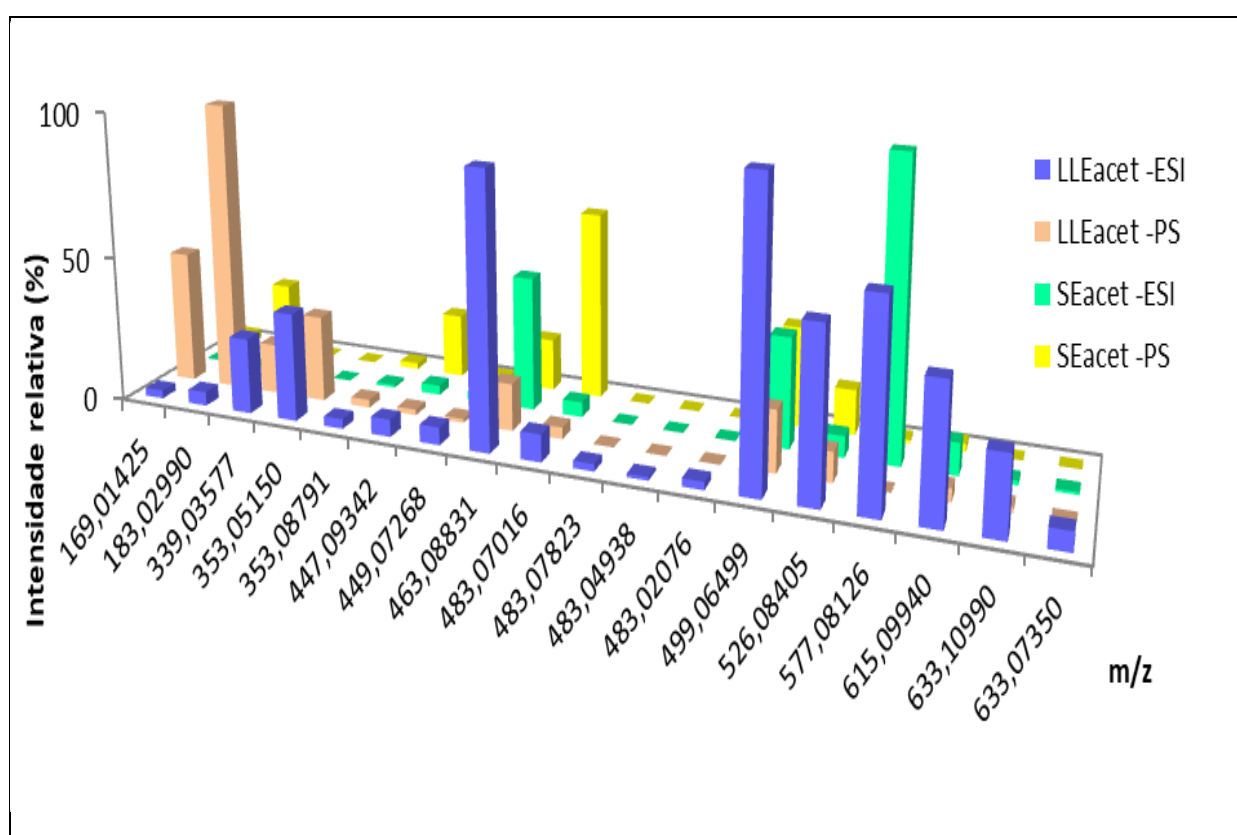


Figura 26. Comparação dos valores de IR de ácidos fenólicos e flavonoides obtidos a partir da fração acetato de etila pelas fontes ESI(-) e PS(-).

4.4.2. LS-MS versus ESI-MS

A análise direta das folhas por (-)-LS-FT-ICR-MS objetivando determinar a presença de flavonoides tais como a miricitrina além de outros compostos fenólicos sem a necessidade de pré-extrações foi realizada (Figuras 27 e 27a). Também foi realizada a análise das folhas frescas submetidas à imersão em diferentes solventes (Tabela 5 e 6).

FA1_partedeabaixo_LS_NEG_000001.d: -MS

FA2_partedeabaixo_LS_NEG_000001.d: -MS

FA3_partedeabaixo_LS_NEG_000002.d: -MS

FA4_partedeabaixo_LS_NEG_000001.d: -MS

FA5_partedeabaixo_LS_NEG_000001.d: -MS

457.20906 459.22475 461.24036 463.08937 467.08441 468.08771 469.00589 475.22010 477.23549

456.71422 459.20641 461.24073 463.08955 464.09322 465.38911 467.08425 468.08770 470.68137 472.25071 475.13205 477.03145

456.51114 458.01768 460.50977 463.08896 465.28759 467.08422 468.77906 473.57245 475.13485 477.10781

457.30734 459.13713 460.29549 463.08938 464.09267 467.07668 469.05566 471.13830 473.26770 475.13168 476.13549

457.5 460.0 462.5 465.0 467.5 470.0 472.5 475.0 477.5 m/z

Tabela 6. Efeito da lavagem com solvente na intensidade dos sinais de miricitrina e seu cluster presentes em folhas de *E. uniflora*.

Amostra	Pré tratamento das folhas por imersão em solventes	Intensidade relativa (%)	
		$C_{21}H_{19}O_{12}$ <i>m/z</i> 463	$C_{21}H_{20}ClO_{12}$ <i>m/z</i> 499
FA ₁	Sem imersão	2.27	4.65
FA ₂	Hexano	6.94	14.74
FA ₃	Hexano e diclorometano	1.74	4.71
FA ₄	Hexano, diclorometano e acetona	3.04	5.18
FA ₅	Hexano, diclorometano, acetona e metanol	16.71	44.65

A baixa Intensidade dos sinais referentes aos flavonoids pode ser explicada pela presença de ácido quinico (m/z 191.05622 and $M = C_7H_{12}O_6$) (DE SOUZA et al., 2017) e carboidratos (m/z 325.07817 and $M = C_{11}H_{18}O_{11}$, m/z 371.1203 and $M = C_{13}H_{24}O_{12}$, m/z 377.08642 and $[M + Cl]^-$, m/z 383.1203 and $M = C_{14}H_{24}O_{12}$) existentes na superfície da folha (DERRIDJ et al., 1996). (Figuras 27 e 27a). Após a lavagem da folha com metanol os sinais referentes aos flavonoides puderam ser observados (tabela 5 e 6). No entanto, após a imersão das folhas em hexano, os valores de Intensidade relativa obtidos para os íons miricitrina $[C_{21}H_{20}O_{12}-H]^-$ e seu cluster $[C_{21}H_{20}O_{12}+Cl]^-$ aumentaram de 2.27% para 6.94% e de 4.65% para 14.74% respectivamente. Esse fato pode ser explicado devido interferência gerada pela cera epicuticular na ionização dos flavonoides, visto que os valores de IR aumentaram após a imersão em hexano (DA SILVA et al., 2005).

Dessa forma é esperado que ocorra um aumento nos valores de IR em FA₃ e FA₄, apesar desse aumento não ocorrer. Isso deve-se ao fato de diferentes folhas terem sido analisadas. Entretanto, em FA₅, após diversas lavagens os valores para a miricitrina (16.71%) e seu cluster (44.65%) aumentam consideravelmente.

O ácido quinico (DE SOUZA et al., 2017) foi o composto melhor ionizado em LS (FA₁-FA₅), e sua intensidade relativa diminuiu de FA₁ para FA₅ como consequência do aumento da sua solubilidade nos solventes utilizados para imersão das folhas (Tabela 6). Devido à natureza ácida dessa molécula a sua ionização é facilitada quando comparada a classe dos flavonoides, de forma a atuar como um supressor iônico (KING et al., 2000; JESSOME e VOLMER 2006). Assim, a medida que são realizadas as sucessivas imersões, com o aumento da polaridade do solvente, a supressão iônica causada pelo ácido quinico é diminuída de forma a aumentar o valor de IR para os flavonoides e diminuir o do ácido quinico.

5. CONCLUSÃO

O extrato *Eugenia uniflora* é uma fonte valiosa de flavonóides e compostos fenólicos com atividade antiviral contra o arbovírus MAYV. A identificação destes compostos presentes no extrato de *E. uniflora* por FT-ICR-MS e a comparação de dois métodos extrativos diferentes foram realizadas. Na identificação por do perfil químico do extrato obtido por ESI(-) - FT-ICR-MS os sinais de maior intensidade foram os que se referem ao íon de miricitrina e seu aduto de cloro formado durante o processo de ionização sendo que outros compostos também foram identificados tais como: myricetin-3-O(2"-O-galoyl)- α -L-rhamnopyranoside [$C_{28}H_{24}O_{16}-H$]⁻, myricetin-3-O(2"-O-galoyl)- α -L-rhamnopyranoside hydrate [$C_{28}H_{26}O_{17}-H$]⁻, ácido galico (m/z 169 - $C_7H_5O_5$), Methyl gallate (m/z 183 - $C_8H_7O_5$) e seus clusters (m/z 339 - $C_{14}H_{11}O_{10}$ e m/z 353 - $C_{15}H_{13}O_{10}$), quercitrina (m/z 447 - $C_{21}H_{19}O_{11}$) e seu aduto de cloro (m/z 483 - $C_{21}H_{20}ClO_{11}$). No que diz respeito a comparação dos dois métodos extrativos realizados, é possível afirmar que ambos apresentaram maior diversidade de flavonóides e taninos na fração de acetato de etila. Além disso, é possível identificar a miricitrina (substância com sinais mais intensos nas análises por FT-ICR MS) seletivamente utilizando a extração em fase sólida em conjunto com a análise por ESI(-) -FT-ICR MS. A extração de compostos fenólicos pela extração líquido/líquido gerou uma maior variedade de íons fenólicos e uma maior intensidade quando comparada à extração por dispersão em fase sólida. O uso de gel de sílica como fase sólida é um fator limitante para a extração de compostos fenólicos, uma vez que os compostos mais polares aderem irreversivelmente a ele. A ionização direta na superfície foliar obteve resultados diferentes e dependentes da imersão das folhas em solventes de polaridade crescente. Somente o flavonóide mais abundante, ou seja, a miricitrina foi ionizado consideravelmente após a extração de ácido quínico e carboidratos da superfície foliar. Embora as fontes ambientais (LS e PS) possuam como vantagens a facilidade no preparo de amostra e simplicidade de análise, considerando os compostos fenólicos de *Eugenia uniflora*, o *eletrospray* foi o método de ionização mais eficiente para a identificação de substâncias biologicamente ativas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, A. et al. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections-A review. **Food Research International**, 77 (2015) 221–235.
- AMIN, M.A.; ALI, M.U.; SHOAIB, M.; RAHMAN, M.S.U. Anti-Dengue Virus Drug Candidate Target NS5 Protein. **Trends in Biosciences** 8(19), Print : ISSN 0974-8431, 5159-5166, 2015a.
- AMIN, M.U; KHURRAM, M; KHATTAK, B; KHAN, J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2015b.
- ALBERICI, R. M. et al. Ambient mass spectrometry: Bringing MS into the “real world”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 265–294, 2010.
- ALICE, C.B; VARGAS, V.M.F ; SILVA, G.A.A.B; DE SIQUEIRA N.C.S; SCHAPOVAL, E.E.S; GLEYED, J; HENRIQUES, J.A.P; HENRIQUES, A.T. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of Efharmacology**, 35 .1991.
- ANDRAE-MAROBELA, K. et al. Polyphenols: A Diverse Class of Multi-Target Anti-HIV-1 Agents. **Current Drug Metabolism**, 2013, 14, 392-413.
- AURICCHIO, M. T; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, p. 55-61, 2003.
- BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JÚNIOR, J. F. da.; ALVES, M. A. Comportamento da Pitangueira (*Eugenia uniflora*) sob Irrigação na Região do Vale do Rio Moxotó, Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v.26, n.1, p.177-179, 2004.
- BOOTS, A.W; HAENEN, G. R; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol**. 2008.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.24, p.119-124, 1985.
- BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.; KONNO, T.U.P.; DUARTE, G.G.; SCIO, E. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharm. Biol.** 47: 44-52, 2009.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York, v.56, n.11, p.317-333, 1998.
- CAJKA, T. et al. Ambient mass spectrometry employing a DART ion source for metabolomic fingerprinting/profiling: A powerful tool for beer origin recognition. **Metabolomics**, v. 7, n. 4, p. 500–508, 2011.
- CARVALHO, A. G. Isolamento e identificação de compostos fenólicos em folhas de *Eugenia uniflora* L. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Goiás, 2013

CARVALHO, T. C. *Paper spray ionization: análise direta de licores do processo de etanol 2G por espectrometria de massas*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015. 97 p.

CHAIT, E. M. Ionization Sources in Mass Spectrometry. **Analitical Chemistry**, 44: 77A- 80A, 1972

CODY, R. B.; DANE, A. J. *Paper spray ionization* for ambient inorganic analysis. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, 28: 893–898, 2014.

CONSOLINI, A.E; BALDINI, O.A; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **J Ethnopharmacol**. 1999 Jul;66(1):33-9.

COOKS, R. G. Ambient Mass Spectrometry. **Science**, 311, 1566-1570, 2006.

CORILO, Y. E. Petroleômica por espectrometria de massas de altíssima resolução e exatidão: informação química precisa e seletiva através de novas estratégias de processamento e visualização de dados. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011. 92 p.

CÓRDOVA, M.M., *et al.* Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neuroscience Letters** Volume 495, Issue 3, 20 May 2011, Pages 173-177.

CUSHNIE, T. P. T; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 26, no. 5, pp. 343–356, 2005.

DA COSTA, M. F., *et al.* Profiles of phenolic compounds by FT-ICR MS and antioxidative and antiproliferative activities of *Stryphnodendron obovatum* Benth leaf extracts. **Analytical Methods**, 2016,8, 6056-6063.

DA CUNHA, F.A.B., *et al.* Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 84 (2016) 614–621.

DALMASCHIO, G. P. Caracterização de Compostos Polares no Petróleo por Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e Exatidão – ESI(±)-FT-ICR MS. **Dissertação** (Mestrado em Química). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2012

DAYEM, A.A . Antiviral Effect of Methylated Flavonol Isorhamnetin against Influenza. **PLoS ONE** 10(3): e0121610. 2015

DE BRUYNE, T et al. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochem Sys Ecol**, 27:445– 459, 1999.

DE GROOT, H; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundam Clin Pharmacol** 1998; 12:249–55.

DI STEFANO, V. et al. Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 74–85, out. 2012.

DOS SANTOS, A.E et al. Quercetin and quercetin 3- Oglycosides from Bauhinia longifolia (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity. **Parasit Vectors**. 2014, 7:130

DOMITROVIĆ, R., et al. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Chemico-Biological Interactions** Volume 230, 25 March 2015, Pages 21-29.

ELIA, G., et al. **In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus**. Antiviral Res 2008, 77:108–113.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A.; **Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications**. New Jersey: Editora John Wiley & Sons Ltd, 2009. 120p.

EMBRAPA. ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B. (Ed.). **III Simpósio nacional do morango**. II Encontro sobre pequenas frutas e Frutas nativas do Mercosul. Documentos 171. Pelotas, 2006.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr Res** 2004;24(10):851-74.

FENN, J. B. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: How It All Began. **Journal of Biomolecular Techniques**, 13: 101-118, 2002.

FIGUEIREDO, P. S. F; OLIVEIRA, R. F; SILVA, J. G; ALCANFOR, S. K. B; ROMEIRO, L. A. S. Avaliação do Perfil Antioxidante da Quercetina e Quercetina-Cu(II) e sua relação com logP. **Anais da 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Aguas de Lindoia, Sao Paulo. 2006.

FIGUEIREDO, A. R. Estudo Teórico e Experimental de Proteômica Estrutural por Espectrometria de Massas Acoplada à Ligação Cruzada. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. 97p.

FISCHER, D et al. Climate change effects on Chikungunya transmission in Europe: geospatial analysis of vector's climatic suitability and virus' temperature requirements. **Int J Health Geogr** 2013, 12:1–12.

FORTES, G.A.C., et al. Antioxidant Activities of Hydrolysable Tannins and Flavonoids Glycosides Isolated from *Eugenia uniflora* L. **Rec. Nat. Prod.** 9:2 (2015) 251-256.

FREITAS, S.; MALACARNE, M. M.; ROMÃO, W.; DALMASCHIO, G. P.; CASTRO, E. V. R.; CELANTE, V. G.; FREITAS, M. B. J. G. Analysis of the heavy oil distillation cuts corrosion by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry, electrochemical impedance spectroscopy, and scanning electron microscopy. **Fuel.**, 104, 656-663, 2013.

FUKUCHI K et al. Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. **Antiviral Research**;11:285-98. 1989

GARCEZ, W.S et al. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvídica Contra *Aedes aegypti*. **Rev. Virtual Quím.** 5 (3), 363-393. 2013.

GARCÍA, A.A.; CARRIL, E.P. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca(Biología)**. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009.

GBOLADE, A.A.; ILESANMI, O.R.; ALADESANMI, A.J. The contractile effects of the extracts of *Eugenia uniflora* on isolated rat duodenum. **Phytother. Res.** 10: 613-615, 1996.

GELDERBLOM, H.R. Structure and Classification of Viruses. In. Baron S, editor. **Medical Microbiology**. 4th edition. Chapter 41. Galveston (TX):University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

GEORGE, D.R et al. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. **Parasit Vectors** 2014, 7:1–12.

GHISLAIN, T.; FAURE, P.; MICHELS, R. Detection and Monitoring of PAH and OxyPAHs by High Resolution Mass Spectrometry: Comparison of ESI, APCI and APPI Source Detection. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, 23, 530-536. 2012. 39

GHOSH S; CHISTI Y; BANERJEE U. C. Production of shikimic acid. **Biotechnol. Adv.** 30. 1425–1431, 2012

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3aed. West Sussex:John Wiley & Sons, Bruxelles, Bélgica, 2007.

HUANG, Min-zong et al. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 702, n. 1, p.1-15, set. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.aca.2011.06.017.

HU, B.; LAI, Y-H.; SO, P-K.; CHEN,H.; YAO, Z-P. Direct ionization of biological tissue for mass spectrometric analysis, **Analyst** .137: 3613–3619, 2012.

JAISWAL, R; MÜLLER, H; MÜLLER, A; KARAR, M.G; KUHNERT, N. Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MS. **Phytochemistry**, 108:252-63, 2014.

KALE, A; GAWANDE, S; KOTWAL, S. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. **Phytotherapy Research**, vol. 22, no. 5, pp. 567–577, 2008.

KHACHATOORIAN, R et al. Divergent antiviral effects of bioflavonoids on the hepatitis C virus life cycle. **Virology**, Volume 433, Issue 2, 2012, Pages 346-355, ISSN 0042-6822, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.029>.

KAMPEN, H; WERNER, D. Out of the bush: the Asian bush mosquito *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) becomes invasive. **Paras Vectors** 2014, 7:59–69.

KEBARLE, P.; VERKERK, U. H. A Brief Overview of the Mechanisms Involved in Electrospray Mass Spectrometry. **Reactive Intermediates**, 35, 804-817, 2000.

KILL, J.B. O que são Designer Drugs? Explorando a sua Composição Química por Espectrometria de Massas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016. 94 p.

KRAJ, A.; DESIDERO, D. M.; NIBBERING, N. M.; EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A. M. Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications. John Wiley & Sons, Bruxellas, Bélgica, 2008.

LEE, E. R; KANG, G. H ; CHO, S. G. Effect of flavonoids on human health: old subjects but new challenges. **Recent Patents on Biotechnology**, vol. 1, no. 2, pp. 139–150, 2007.

LEE, M.H; CHIOU, J.F; YEN, K.Y; YANG, L.L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, Amsterdam. 154: 131-136. (2000).

LEE, M.I; NISHIMOTO, S; YANG, L.L; YEN, K.Y; HATANO, T; YOSHIDA, T; OKUDA, Y. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, 44:1343-1349. (1997).

LI, A.; WANG, H.; OUYANG, Z.; COOKS, R.G. *Paper spray ionization* of polar analytes using non-polar solvents. **Chemical Communications**, 47:2811–2813, 2011.

LIN, L.Z; HARNLY, J.M. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **Food Chemistry** 120, 319–326, 2010.

LIRA JUNIOR, J.S; BEZERRA, J.E.F; LEDERMAN, I.E; DA SILVA JUNIR, J.F. Pitangueira. Recife : Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, 2007. 87p

LIU, C. et al. Identification of hydrolyzable tannins (punicalagin, punicalin and geraniin) as novel inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. **Antiviral Research** Volume 134, October 2016, Pages 97–107.

LIU, G.; SNAPP, H. M.; JI, Q. C. Internal standard tracked dilution to overcome challenges in dried blood spots and robotic sample preparation for liquid chromatography/tandem mass spectrometry assays. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 25: 1250–1256, 2011.

LIU, J; WANG, H; COOKS, G; OUYANG, Z. Leaf Spray: Direct Chemical Analysis of Plant Material and Living Plants by Mass Spectrometry. **Anal. Chem.** 2011, 83, 7608–7613

LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N.E.; LIN, J-M.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Development, Characterization, and Application of *Paper Spray Ionization*. **Analytical Chemistry**, 82: 2463–2471, 2010.

LIU, C. et al. Identification of hydrolyzable tannins (punicalagin, punicalin and geraniin) as novel inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. **Antiviral Research** Volume 134, October 2016, Pages 97–107.

MALAJ, N; OUYANG, Z; SINDONA, G; COOKS, R.G. Analysis of pesticide residues by leaf spray mass spectrometry. **Anal. Methods**, 2012, 4, 1913–1919.

MARQUES, J.S. Compostos ativos de folhas de *Eugenia uniflora* e seus efeitos contra mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro. 2014. 94p. **Dissertação** (mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2014.

MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, C. L. Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations. **International Journal Of**

Mass Spectrometry, 215, 59-75, 2002.

MARSHALL, A.G.; HENDRICKSON, C.L.; ERNMETTA, M.R.; RODGERS, R.P.; BLAKNEY, G.T.; NILSSON, C.L. Fourier transform ion cyclotron resonance: state of the art. **European Journal of Mass Spectrometry**, 13:57-9, 2007.

MARTINEZ-CORREAA, H.A.; MAGALHAES, P.M.; QUEIROGA, C.L.; PEIXOTO, C.A.; OLIVEIRA, A.L.; CABRAL, F.A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **J. of Supercritical Fluids** 55 (2011) 998–1006.

Mass Spectrometry Facility |FTICRMS. Disponível em: <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/fticrms.xhtml>>. acesso em 03 de Agosto de 2017.

MEOTTI, F. C. Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: estudos in vivo e in vitro. **Tese** (Doutorado em Bioquímica Toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul. (2006).

MEOTTI, F.C *et al.* Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 316, no. 2, pp. 789–796, 2006.

MEOTTI, F.C., *et al.* Antinociceptive action of myricitrin: Involvement of the K⁺ and Ca²⁺ channels. **European Journal of Pharmacology** 567 (2007) 198–205.

MORTON, J.F. Surinam cherry. In: MORTON, J.F. Fruits of warm climates. Miami: **Ag Science**, 1987. p.386–388.

MULLER, T.; COOKS, R.G. **Bull. Korean Chem. Soc.**, 2014, 35,919–924.

NAKASHIMA H *et al.* Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. **Antiviral Res** 1992;18:91-103.

NEUMAYR, A *et al.* Mayaro virus infection in traveler returning from Amazon Basin, Northern Peru. **Emerg Infect Dis** 2012, 18:695–696.

NETO, M. B. Método Absoluto e Geral para a Avaliação Estrutural Direta de Isômeros Constitucionais por Espectrometria de Massas Pentaquadrupolar. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. 199 p.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod** 2012, 75:311–335

NIJVELDT, R.J *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**; 74:418–25. 2001.

OGAWA, E. M. Perfil químico associado aos diferentes estádios de maturação do abacaxi cv. Vitória por ESI(-)-FT-ICR MS e estudo de suas atividades biológicas na quimioprevenção de câncer. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016. 64 p

PENG, L. Q., *et al.* Determination of natural phenols in olive fruits by chitosan assisted matrix solid-phase dispersion microextraction and ultrahigh performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**. 2016 Jul 22;1456:68-76.

PEREIRA, T. M. C. Aplicações da Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclônica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR MS) em Petroleômica. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013. 140 p.

PERES, R. G. Aplicações de CE-DAD E HPLC-DAD-ESI/MS na determinação de compostos fenólicos, metilxantinas e ácidos orgânicos em bebidas. **Tese** (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 201p. (2007).

PESSANHA, F. F. “*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): caracterização e avaliação dos compostos fenólicos, da vitamina C e da atividade antioxidante dos frutos da pitangueira”. **Dissertação** (Mestre em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ. 2010

PLANTAS de interesse ao SUS. Portal da Saúde, maio 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>> Acesso em: 4 ago. 2017.

POLITI, F.A.S *et al.* Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Parasit Vectors** 2012, 5:295–306.

QI, S., *et al.* Myricitrin Modulates NADPH Oxidase-Dependent ROS Production to Inhibit Endotoxin-Mediated Inflammation by Blocking the JAK/STAT1 and NOX2/p47phox Pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Volume 2017, Article ID 9738745, 20 pages.

QIU *et al.* Prophylactic Efficacy of Quercetin 3--O-D-Glucoside against Ebola Virus Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. September 2016 Volume 60 Number 9

RAFFA, D., *et al.* Recent discoveries of anticancer flavonoids. **Eur. J. Med. Chem.** 2017, 1-16.

RATTMANN, Y.D *et al.* Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2012;2012:623940. doi: 10.1155/2012/623940. Epub 2012 Dec 20.

RIBÉREAU-GAYON, P. Les composés phénoliques des végétaux. **Paris: Dunod**, 1968. 254p

ROMÃO, W. Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. 201 p.

ROMÃO, W; BONIEK, G.V; PEREIRA, I; RODRIGUES, S.R. M; CARVALHO, T. C;

CARVALHO, V.V; LOBON, G.S; BASSANE, J.F.P; DOMINGOS, E; AUGUSTI, R. Rapid screening of agrochemicals by *paper spray ionization* and leaf spray mass spectrometry: which technique is more appropriate?. **Anal. Methods**, 2016, 8, 6023–6029

ROTMAN, A.D. Las especies argentinas del género *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, 30 (1995), pp. 63–93

SANTOS, D.N; DE SOUZA, L.L; FERREIRA, N.J; DE OLIVEIRA, A.L. Study of supercritical extraction from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) with bioactive compounds. food and bioproducts processing .94 (2015) 365–374

SANTOS, V. G. Novas Propostas para o Estudo de Mecanismos de Reações Orgânicas por Espectrometria de Massas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011. 117 p.

SCHAFFNER, F et al. Development of guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. **Paras Vectors** 2013, 6:209–219.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G; THEODULOZ, C; FRANCO, L; FERRO E; ARIAS, A. R. de. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacol**, Limeric. v. 21, p. 183-186, 1987.

SCHUMACHER, N.S., et al. Identification and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia uniflora* Leaves. Characterization of the Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Extract on Diabetes Expression in an Experimental Model of Spontaneous Type 1 Diabetes (NOD Mice). **Antioxidants** 2015, 4

SIMÕES C. M. O; SCHENKEL E. P; GOSMANN G; MELLO J. C. P; MENTZ L. A; PETROVICK P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º Ed. Porto Alegre – RS, Editora da UFRGS, 2010. 519p.

SELEEM, D. et al., Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity in vitro, **Archives of Oral Biology** (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.030>.

SHEN, L.; ZHANG, J.; YANG, Q.; MANICKE, N. E.; OUYANG, Z. High throughput *paper spray* mass spectrometry analysis. **Clinica Chimica Acta**, 420, 28-33, 2013.

SHI, Q.; HOU, D.; CHUNG, K. H.; XU, C.; ZHAO, S.; ZHANG, Y. Characterization of heteroatom compounds in a crude oil and its saturates, aromatics, resins, and asphaltenes (sara) and non-basic nitrogen fractions analyzed by negative-ion electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Energy Fuels**, 24, 2545-2553, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: Ltc, p. 508, 2007.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutrição**, Campinas, 15(1):71-81, 2002.

SPINDOLA, K.C.W et al. Anti-Mayaro virus activity of *Cassia australis* extracts

(Fabaceae, Leguminosae). **Parasites & Vectors** 2014, 7:537.

TOSATO, F. Aplicação da Espectrometria de Massas Ambiente por *Paper Spray Ionization* na Identificação e Quantificação de Cocaína e no Controle de Qualidade de Bebidas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016. 77 p.

VAZ, B. G. Petrolômica por FT-ICR MS: Desvendando a Composição de Polares do Petróleo e Derivados. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. 191 p.

VASCONCELOS, P.F.C; ROSA, A.P.A.T; PINHEIRO, F.P; SHOPE, R.E; ROSA, J.F.S.T; RODRIGUES, S.G; DÉGALLIER, N; DA ROSA, E.S.T. Arboviruses Pathogenic For Man In Brazil. In An Overview Of Arbovirology In Brazil And Neighbouring Countries. Edited by Rosa APAT, Vasconcelos PFC, Rosa JFST. Belém: **Instituto Evandro Chagas**; 1998:72–99

VENTER, A.; NEFLIU, M.; COOKS, G. R. Ambient desorption ionization mass spectrometry. **TrAC -Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 284–290, 2008.

WAGNER, M.; TONOLI, D.; VARESIO, E.; HOPFGARTNER, G. The use of Mass spectrometry to analyse dried blood spot. **Mass Spectrometry Reviews**, 1–78, 2014.

WAZLAWIK, E; SILVA, M. A. da; PETERS, R. R; CORREIA, J. F; FARIAS, M. R; CALIXTO, J. B; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 433-437, 1997.

WEAVER S.C; REISEN, W.K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res.** 2010 Feb;85(2):328-45.

WANG, H.; REN, Y.; MCLUKEY, M.N.; MANICKE, N.E.; PARK, J.; ZHENG, L.; SHI, R.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Direct Quantitative Analysis of Nicotine Alkaloids from Biofluid Samples using *Paper Spray* Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, 85: 11540-11544, 2013.

YANG, Z.F et al. Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis. **Fitoterapia**, 93:47-53, 2014.

YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J.D.; CHAPPELL, W.J.; MANICKE, N.E.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. *Paper spray ionization* devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, 312: 201–207, 2012.

YASUHARA-BELL, J; YUANAN, L. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral Res** 2010, 86:231–240.

YOKOMIZO, A; MORIWAKI, M. Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. *Biosci Biotechnol.* **Biochem.** 69: 693-

699. (2005).

ZHANG, J. I.; LI, X.; OUYANG, Z.; COOKS, R.G. Direct analysis of steviol glycosides from *Stevia* leaves by ambient ionization mass spectrometry performed on whole leaves. **Analyst**, 137: 3091–3098, 2012.

ZHANG, Y.; JU, Y.; HUANG, C.; WYSOCKI, V.H. *Paper Spray Ionization* of Noncovalent Protein Complexes. **Analytical Chemistry**, 86: 1342-1346, 2014.

ZHANG, Z.; LIU, X.; ZHENG, Y. Ambient Ionization-*Paper Spray Ionization* and Its Application. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, 42, 145-152, 2014.

MUELLER-HARVEY, *Animal feed science and technology*, 2001, **1-2**, 91;

M. H. LEE, S. NISHIMOTO, L. L. YANG, K. YEN, T. HATANO, T. YOSHIDA AND T. OKUDA, *Phytochemistry*, 1997, **7**, 44;

F. CUYKENS, M. CLAEYS. *J MASS SPECTROM*, 2005, **3**, 40;

C.E.S. DE SOUZA, A. R.P. DA SILVA, J.E. ROCHA, M.C.V. GOMEZ, M.R.C. CORONEL, J.G.M. DA COSTA, M.L.C. NETO, L.A. ROLIM, H.D.M. COUTINHO. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(9): 836–841;

S. DERRIDJ, B.R WU, L. STAMMITTI, J.P GARREC, A. DERRIEN, *Etmologia Experimentalis et Applicata*, V 80, 1996. 197–201;

L.C. DA SILVA, M.A. OLIVA, A.A. AZEVEDO, J.M. ARAUJO, R.M.AGUIAR, *Water, Air and Soil Pollution*, 2005, **168**, 1-4, 129-143;

R. KING, R.BONFIGLIO, C. FERNANDEZ-METZLER, C. MILLER-STEIN, T. OLAH. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2000, 11, 942–950

;

L.L JESSOME, D.A. VOLMER. *LCGC North America*, V.24, n.5, 2006;

ANEXO

Tabela de compostos fenólicos já relatados em extrato de folhas de *Eugenia uniflora*

MW	[M-H] ⁻	Fragmentos (m/z)	Formula	Composto	Classe	Referência*
302	300.99951	229	C ₁₄ H ₆ O ₈	Ellagic acid	Phenolic acid	a
418	417.08456	285	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	Kaempferol pentoside	flavonoids	a
432	-	-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Afzelin	flavonoids	b
434	433	301, 271, 255	-	Quercetin arabinose	flavonoids	d
434	433.04151	301	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	Ellagic acid pentoside	-	a
448	447	301, 271, 255	-	Quercetin rhaminoside	flavonoids	d
448	447.05704	301	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	Ellagic acid deoxyhexoside	-	a
448	447.09391	300, 301	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Quercitrin	flavonoids	a
450	449	316, 287, 271	-	Myricetin- arabinose	flavonoids	d
464	463	300, 271, 255	-	Quercetin hexoside	flavonoids	d
464	463.08849	301	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetin hexoside	flavonoids	a
464	463	316, 287, 271	-	Myricetin rhaminoside	flavonoids	d
464	-	-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Myricitrin	flavonoids	b
480	479	316, 287, 271	-	Myricetin hexoside	flavonoids	d
484	-	-	-	2,3-di-O-galloyl-β-D-glucose	Galloylglucoses	b
540	539	169, 151, 123	-	n.i	-	d
600	599	447, 300, 285, 169, 124	-	Quercetin rhaminosyl gallate	flavonoids	d
610	609	463, 300, 271	-	Quercetin rhaminosyl hexoside	flavonoids	d
616	-	-	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	Desmanthin-1	flavonoids	b
616	615	463, 300, 271, 169	-	Quercetin hexosyl gallate	flavonoids	d
616	615.0972	-	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	miricetina-3-O-(2"-O-galoi)-α-L-ramnopiranosídeo	flavonoids	b
632	631	479, 316, 287, 169	-	Myricetin-hexosyl-gallate	flavonoids	d
634	633.0719	-	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	Gemin D	Ellagitannins	b, c
634	633.0751	-	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	hippomanin A	Ellagitannins	b, c
654	653	501, 463, 317, 169, 124	-	n.i	-	d
940	-	-	-	1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose	Galloylglucoses	b
1418	1417.1458	-	C ₆₁ H ₄₆ O ₄₀	Camptothin A	Ellagitannins	b, c
1568	1567.1438	-	C ₆₈ H ₄₈ O ₄₄	Oenothien B	Ellagitannins	b, c
1584	-	-	-	Eugeniflorin D ₂	Ellagitannins	b

Fonte: **a*** (Adaptado de OLIVEIRA et al., 2014); **b*** (Adaptado de FORTES et al., 2015); **c*** (Adaptado de CARVALHO, 2013); **d*** (Adaptado de RATTMANN et al., 2012).